

ФАРМАКОЛОГИЯ ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЫ

ВЛИЯНИЕ ЛИМИГЛИДОЛА НА ДПП-4 И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОСТРОВКОВОГО АППАРАТА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

А. А. Спасов^{1, 2}, Н. И. Чепляева¹, К. В. Ленская¹, Г. Л. Снигур^{1, 2}

Исследовано влияние лимиглидола на активность дипептидилпептидазы типа 4 (ДПП-4) *in vitro* и *in vivo* и морфологические показатели островкового аппарата поджелудочной железы. В результате выявлено, что лимиглидол в условиях *in vitro* дозозависимо ингибировал ДПП-4, однако по активности значительно уступал препаратам сравнения вилдаглиптину, ситаглиптину, дипротину А. На модели стрептозотоцинового сахарного диабета (СД) при курсовом введении лимиглидол корректировал уровень гликемии, однако не влиял на активность ДПП-4.

Ключевые слова: сахарный диабет; лимиглидол; дипептидилпептидаза типа 4; инкретины; регенерация β -клеток.

ВВЕДЕНИЕ

Лимиглидол (производное 9-диэтиламиноэтил-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазола) — антидиабетический препарат, усиливающий секрецию инсулина и обладающий гемореологической активностью [1]. Сахароснижающий эффект лимиглидола был подтвержден в исследованиях на интактных животных разных видов (крысы, кролики, собаки) с экспериментальным (аллоксановым, стрептозотоциновым) диабетом [1 – 4]. Проведена третья фаза клинических испытаний, в которых была подтверждена антидиабетическая активность лимиглидола [1].

В экспериментах по исследованию механизма действия соединения продемонстрировано, что в ответ на его внутривенное введение наблюдалось увеличение инсулина в крови наркотизированных кошек, сочетающееся с сахаропонижающим эффектом, что, возможно, является доказательством инсулинотропного эффекта, основанного на стимулировании функционально способных β -клеток островков Лангерганса. Следует отметить, что повышение уровня гормона приходится на 1-ю фазу секреции инсулина [3]. Одним из эндогенных регуляторов секреции инсулина являются гастроинтестинальные гормоны (инкретины). Эти гормоны синтезируются в энтероэндокринных клетках желудочно-кишечного тракта и выделяются в ответ на прием пищи и представлены глюкагоноподобным полипептидом-1 (ГПП-1) и гастроингибирующим полипептидом (ГИП). Важнейшим физиологическим эффектом инкретинов является потенцирование глюко-

зостимулированной секреции инсулина. Помимо инсулинотропного действия, ГПП-1 участвует в регуляции процессов регенерации и неогенеза β -клеток. Период циркуляции эндогенных или экзогенных инкретинов в крови чрезвычайно мал в связи с быстрой инактивацией инкретинов под влиянием фермента ДПП-4, отвечающего за начальный распад ГПП-1 и ГИП [10]. Вследствие этого фермент является мишенью для поиска и создания препаратов — ингибиторов ДПП-4. Следует отметить, что рядом авторов была выявлена ДПП-4 ингибирующая активность у лимиглидола: ИК₅₀ составила (150,5 ± 17,9) нМ, и соединение уступало в 29 раз вилдаглиптину и в 6 раз — ситаглиптину. Таким образом, предположительный механизм действия данного вещества включает ингибирование ДПП-4 и модуляцию инсулиносекреторной функции поджелудочной железы [5].

Исходя из вышеизложенного, представляется интересным проверить влияние препарата лимиглидола на ингибирование ДПП-4 и на регенерацию β -клеток при стрептозотоциновом экспериментальном диабете.

Целью данного исследования явилось изучение влияния соединения лимиглидола на активность ДПП-4 *in vivo* и *in vitro* и на состояние островкового аппарата поджелудочной железы крыс при стрептозотоциновом экспериментальном диабете.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для оценки ДПП-4 ингибиторной активности *in vitro* смешивали 10 мкл раствора исследуемого соединения в диапазоне концентрации с 50 мкл 0,1 М Трис-НС1 буфера (рН 8,4) и 40 мкл плазмы человека. Анализируемую смесь преинкубировали при 37 °С в течение 5 мин. После преинкубации добавляли 100 мкл 1 мМ субстрата реакции Гли-Про-*p*-нитроани-

¹ Волгоградский государственный медицинский университет, 400031, Россия, Волгоград, пл. Павших Борцов д. 1.

² Волгоградский медицинский научный центр, 400031, Россия, Волгоград, пл. Павших Борцов д. 1.

лида (Sigma, США), полученную смесь инкубировали при 37 °С в течение 15 мин. Развитие желтого окрашивания из-за высвобождения 4-нитроанилина определяли при длине волны 405 нм, используя прибор для спектрофотометрического считывания планшетов (ELx800, BioТес, США) [9]. В качестве препаратов сравнения были выбраны ситаглиптин (Sigma, США) и вилдаглиптин (Новатрис Фарма АГ, Швейцария), в концентрациях 1000 – 1 нМ, дипротин А (Sigma, США) в концентрациях 100 – 0,1 мкМ, лимиглидол (9-диэтиламиноэтил-2,3-дигидроимидазо[1,2- α]бензимидазола) (“ООО След”, Россия) в концентрациях 1 – 1000 мкМ. Величину ингибирования рассчитывали по следующей формуле: (контроль — тест/контроль) · 100 %. Значения ИК₅₀ подсчитывали, используя Graphit 4.0.15 (Erithacus Software, Ltd, UK).

Эксперименты проводили на 70 половозрелых нелинейных белых крысах-самцах массой 250 – 300 г (ООО “Питомник РАМТН”, Москва), содержащихся в условиях вивария с естественным световым режимом на полноценном рационе. Исследование проводили в соответствии с требованиями “Правил лабораторной практики”, утвержденных приказом Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 № 708н, с соблюдением положений “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях”.

Гипогликемическое действие изучали на животных со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом. Моделировали диабет с использованием стрептозотина (Sigma, США) (45 мг/кг однократно внутривенно на цитратном буфере, рН = 4,5) [8]. Гипогликемическое действие субстанции лимиглидола изучали при ежедневном пероральном введении водного раствора животным в дозе 50 мг/кг в течение 28 дней. Уровень глюкозы в плазме крови оценивали с помощью набора “Глюкоза ФКД” (Россия). Динамику уровня глюкозы в плазме крови крыс оценивали еженедельно. Животных тестировали на толерантность к углеводам при пероральной нагрузке глюкозой (ч.д.а., “Экрос”, Россия) в дозе 3 г/кг на 14, 28 сут курсового введения. За 12 ч до эксперимента животные подвергались пищевой депривации со свободным доступом к воде. За 2 ч до проведения теста опытным животным перорально вводили исследуемые препараты, крысам

Таблица 1. ДПП-4 ингибирующая активность вилдаглиптина, ситаглиптина, дипротина А и лимиглидола

Соединение	ИК ₅₀ (95 %, ДИ)
Ситаглиптин	3,39 – 21,50 нМ
Вилдаглиптин	6,73 – 24,91 нМ
Дипротин А	6,06 – 30,03 мкМ
Лимиглидол	1,35 – 2,05 мМ

контрольной группы — дистиллированную воду в аналогичном объеме. Образцы крови для оценки гликемии забирали до введения препаратов, перед введением глюкозы, через 30 мин после введения глюкозы и далее в течение 2 ч с 30-минутными интервалами. Уровень глюкозы определяли в цельной крови вышеуказанным способом. Скорость утилизации глюкозы оценивали, исходя из степени снижения площади под кривой “содержание глюкозы — время” [6].

Оценку активности ДПП-4 в плазме животных проводили по стандартному протоколу (Sigma) и выражали в нмоль р-нитроанилида, образовавшегося в результате реакции в мл реакционной смеси в минуту.

На 28 день после курсового введения препаратов у наркотизированных животных (хлоралгидрат, 400 мг/кг) осуществляли забор поджелудочной железы для морфологических исследований. Для гистологического исследования ткани поджелудочной железы брали желудочный фрагмент поджелудочной железы. Полученный материал фиксировали в 10 % растворе нейтрального забуференного формалина (рН 7,4) в течение 24 ч. По общепринятым гистологическим методикам изготавливали парафиновые срезы с последующей окраской гематоксилином и эозином. Визуализацию эндокриноцитов β -клеток островков Лангерганса проводили при иммуногистохимической реакции с моноклональными антителами к инсулину (клон Ab-6 (INS04 + INS05) фирмы LabVision, Великобритания) с помощью непрямого иммунопероксидазного метода, без предварительной демаскировки антигенов согласно протоколам фирм-производителей [7]. Фотопротоколирование микроскопических изменений производили с использованием микроскопа “AxioScore” (CarlZeiss, Германия) и цифровой фотокамеры “PowerShot” (Canon, Япония). Морфометрический анализ проводили с помощью компьютерной программы “Видео ТестМорфо-4” (Россия). Определяли

Таблица 2. Влияние лимиглидола в дозе 50 мг/кг на уровень глюкозы (ммоль/л) крыс со стрептозотоциновым экспериментальным диабетом при пероральном тесте оценки толерантности к глюкозе (3 г/кг, 14 день) ($M \pm m$)

Группа животных	Исход	90 мин	120 мин	Площадь под кривой “глюкоза – время”, у. е.
Интактные	3,91 ± 0,31	7,02 ± 0,15	5,7 ± 0,08	806,3 ± 145,37
Стрептозотоциновый диабет	14,05 ± 0,23	17,36 ± 0,37	15,8 ± 0,22	2089,64 ± 167,25*
Стрептозотоциновый диабет + лимиглидол 50 мг/кг	10,25 ± 1,73	11,48 ± 1,92	10,63 ± 0,78	1122,33 ± 232,33**

* Достоверно по отношению к контролю ($p < 0,05$);

** Достоверно по отношению к группе с экспериментальным СД ($p < 0,05$).

Таблица 3. Влияние лимиглидола в дозе 50 мг/кг на уровень глюкозы (ммоль/л) крыс со стрептозотоциновым экспериментальным диабетом при пероральном тесте толерантности к глюкозе (3 г/кг, 28 день) ($M \pm m$)

Группа животных	Исход	90 мин	120 мин	Площадь под кривой "глюкоза — время", у. е.
Интактные	3,52 ± 0,25	7,83 ± 0,18	6,92 ± 0,3	932,52 ± 186,60
Стрептозотоциновый диабет	20,24 ± 0,97	24,49 ± 0,95	23,66 ± 0,96	2656,47 ± 210,91*
Стрептозотоциновый диабет + лимиглидол 50 мг/кг	13,75 ± 2,81	15,02 ± 3,01	13,34 ± 2,7	1610,59 ± 318,55**

* Достоверно по отношению к контролю ($p < 0,05$).

** Достоверно по отношению к группе с экспериментальным СД, критерий Стьюдента ($p < 0,05$).

удельное количество β -клеток панкреатических островков по отношению к общему количеству клеток островков (%).

Результаты обрабатывали методами базисного статистического анализа на ПК с использованием программы Microsoft Office Excel (Microsoft, USA) и STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., USA). Оценка нормальности распределения проводилась по критерию Шапиро-Уилка. Анализ параметров при нормальном распределении значений проводили с помощью критерия Стьюдента. Гипотезу о существовании различий между выборками принимали при уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании способности известных препаратов (вилдаглиптин, ситаглиптин, дипротин А) ингибировать ДПП-4 и гомологичные ферменты плазмы крови человека выявлено, что зависимость доза — эффект носила сигмовидный характер. Полученные данные показателей ИК₅₀ согласуются с результатами исследований, согласно которым она составляет для ситаглиптина 19 нМ, вилдаглиптина — 62 нМ (табл. 1) [11]. Дипротин А — трипептид (Ileu-Pro-Ileu) — одно из первых соединений, используемых в качестве ингибитора ДПП-4 в экспериментальных исследованиях, в данном исследовании по активности значительно уступало вилдаглиптину и ситаглиптину и ингибировало фермент в микромолярных концентрациях. Лимиглидол (ИК₅₀ = 1,67 мМ) значительно уступал по способности ингибирования дипептидилпептидазы вилдаглиптину, ситаглиптину и дипротину А. Следует отметить, что соединение демонстрирует низкий уровень

активности, что говорит о том, что ДПП-4 не является основной мишенью действия для вещества.

Разница показателей ИК₅₀ в данном исследовании, по сравнению с ранее проведенными исследованиями, возможно объясняется тем, что в данном эксперименте для оценки ДПП-4 ингибирующей активности субстратом реакции являлся Гли-Про-*p*-нитроанилид, продукт реакции детектировался спектрофотометрическим методом, в ранее проведенных исследованиях в качестве субстрата использовался Гли-Про-7-амидо-4-метилкумарин и регистрировалась флуоресценция. В ходе эксперимента на животных с экспериментальным стрептозотоциновым диабетом было выявлено, что изучаемое нами соединение проявляло выраженный гипогликемический эффект. В ходе курсового введения лимиглидола (50 мг/кг) крысам с СД уровень глюкозы в крови через неделю уменьшался на 34 %, по сравнению с данными гликемии крыс с СД контрольной группы, стойкое снижение сохранялось на протяжении всего эксперимента, достигнув минимальных величин к 28 дню введения препарата (снижение уровня глюкозы в крови на 47 %, по сравнению с показателями животных с СД) (табл. 2, 3).

При проведении теста оценки толерантности к глюкозе на 14 день эксперимента у крыс со стрептозотоциновым экспериментальным диабетом отмечалось стойкое повышение уровня глюкозы в крови, которое достигало максимума к 90 мин исследования (табл. 2).

Концентрация глюкозы превышала значения у крыс группы интактного контроля практически в 3 раза во все временные промежутки наблюдений. Данные подтверждались достоверным увеличением площади под кривой "глюкоза — время" у животных с экспериментальным диабетом в 2,8 раза, по отношению к интактной группе, что, возможно, свидетельствует о нарушении всасывания глюкозы в кишечнике, снижении захвата глюкозы периферическими тканями и снижении секреции инсулина [6]. Уровень гликемии в опытной группе животных, получавших лимиглидол (50 мг/кг), был ниже, чем в контрольной группе с СД во всех временных промежутках, кроме того выявлено уменьшение площади под кривой утилизации глюкозы в 1,7 раза по отношению к группе с СД без применения лекарственных веществ.

Таблица 4. Активность ДПП-4 в крови у животных с экспериментальным стрептозотоциновым СД (курсовое введение лимиглидола, 28 дней) ($M \pm m$)

Группа животных	Активность ДПП-4, ммоль/мл/мин
Интактные	2,40 ± 0,12
Стрептозотоциновый диабет	3,54 ± 0,43*
Стрептозотоциновый диабет + лимиглидол 50 мг/кг	3,38 ± 0,28*

* Данные статистически значимы по отношению к интактному контролю ($p < 0,05$).

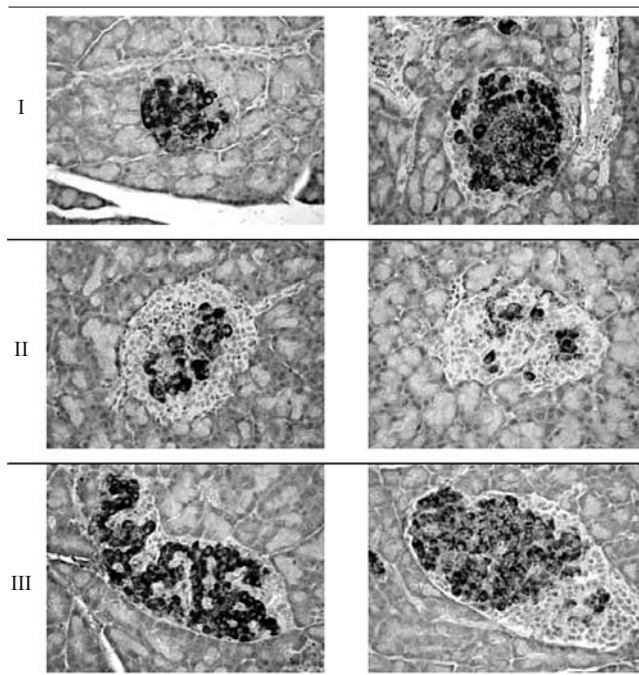
На 28 день исследования наблюдались изменения, аналогичные 14 дню исследования (табл. 3).

Помимо этого, при экспериментальном стрептозотоциновом диабете активность ДПП-4 увеличивалась на 48 %, а курсовая терапия лимиглидолом в дозе 50 мг/кг не приводила к значимым изменениям данного показателя (табл. 4).

При морфологическом исследовании поджелудочной железы у крыс контрольной интактной группы удельное количество инсулиноцитов в кишечном отделе поджелудочной железы составляло ($65,4 \pm 4,5$) %, в желудочном — ($71,9 \pm 6,6$) % (табл. 5). В группе со стрептозотоцин-индуцированным СД в поджелудочной железе на 28 день исследования отмечалось незначительное полнокровие кровеносных капилляров, умеренная очаговая лимфогистиоцитарная инфильтрация островков — “инсулит”, некробиотические изменения эндокриноцитов островков Лангерганса и умеренная гипертрофия ядер функционирующих β -клеток (рисунок). Количество инсулин-позитивных клеток уменьшалось во всех отделах железы, а в отдельных островках инсулиноциты отсутствовали. Так, удельное количество β -эндокриноцитов в желудочном отделе статистически достоверно снижалось на 55 % ($p < 0,05$) по отношению к группе интактного контроля (табл. 5).

Лимиглидол при введении животным с стрептозотоциновым диабетом в поджелудочной железе вызывает мозаичную морфологическую картину. В островках выявлялись явления умеренного полнокровия кровеносных капилляров с очаговой инфильтрацией островков лимфоцитами и гистиоцитами. Отмечалась выраженная гипертрофия ядер β -эндокриноцитов. Визуализировались некробиотические изменения инсулиноцитов (в отдельных островках вплоть до полного отсутствия). В некоторых островках сохранялись единичные разрозненные инсулин-позитивные клетки (рисунок). Наблюдалось статистически незначимое увеличение удельного количества β -эндокриноцитов по отношению к группе СД без терапии.

Таким образом, в ходе проведенного исследования выявлено, что лимиглидол в тест-системе *in vitro* проявляет низкую ДПП-4 ингибирующую активность, уступая препаратам сравнения вилдаглиптину, ситаглиптину, дипротину А. Однако при курсовом введении препарата при стрептозотоциновом СД лимиглидол не оказывал влияния на активность фермента в плазме крови, что вероятно связано с невозможностью достижения в крови необходимой концентрации препарата для развития ингибиторных эффектов. Полученные экспериментальные данные при курсовом введении также свидетельствуют об отсутствии ДПП-4 ингибирующей активности у метаболитов лимиглидола, которую возможно оценить в экспериментах *in vitro*. Морфологическое исследование продемонстрировало, что лимиглидол статистически незначимо увеличивает



Распределение β -клеток по панкреатическим островкам: I — интактный контроль, II — стрептозотоцин-индуцированный СД, III — стрептозотоцин-индуцированный СД + лимиглидол. Первичные антитела к инсулину, визуализация диаминобензидином с докраской гематоксилином. Начальное увеличение: 40 \times .

удельное количество β -эндокриноцитов, что объясняется снижением воспалительных и деструктивных изменений островкового аппарата поджелудочной железы вследствие снижения уровня глюкозы и глюкозотоксичности. Гипогликемический эффект лимиглидола, обнаруженный на животных со стрептозотоцин-индуцированным диабетом, связан с его поливалентным механизмом действия и увеличением утилизации глюкозы периферическими тканями и усилением гипогликемического эффекта инсулина [1].

ВЫВОДЫ

1. Лимиглидол ингибировал ДПП-4 в тест-системе *in vitro* ($ИК_{50} = 1,67$ мМ) и был менее активен, чем

Таблица 5. Влияние лимиглидола в дозе 50 мг/кг (курсовое введение, 28 дней) на морфометрические показатели эндокринной части поджелудочной железы крыс со стрептозотоциновым экспериментальным диабетом ($M \pm m$)

Группа животных	Удельное количество β -клеток, %
Интактный контроль	$71,9 \pm 6,6$
Стрептозотоцин-индуцированный СД	$46,5 \pm 8,2^*$
Стрептозотоцин-индуцированный СД + лимиглидол 50 мг/кг	$58,4 \pm 7,4$

* Достоверно по отношению к интактному контролю ($p < 0,05$).

вилдаглиптин в 195 000 раз, ситаглиптин — в 129 000 раз и дипротин А — в 123 раза.

2. Лимиглидол (50 мг/кг перорально) не оказывал влияния на активность ДПП-4 после 28-дневного курсового введения крысам со стрептозотоциновым диабетом.

3. Лимиглидол (50 мг/кг, перорально, 1 раз в сут, 28 дней) статистически значимо снижал на 64 % ($p < 0,05$) площадь под кривой “глюкоза – время” при стрептозотоциновом диабете.

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 14-25-00139).

ЛИТЕРАТУРА

1. И. И. Дедов, М. И. Балаболкин, А. А. Спасов и др., *Материалы IV Всероссийского диабетологического конгресса*, Москва (2008), сс. 35 – 36.
2. Г. П. Дудченко, А. Ф. Турчаева, С. Г. Ковалев, *Вестник Волгогр. мед. академии*, **1**, 33 – 36 (1995).

3. Г. П. Дудченко, А. А. Спасов, Н. А. Гурова, *Вестник Волгоград. мед. академии*, **6**, 46 – 49 (2000).
4. А. А. Спасов, А. Ф. Кучерявенко, М. В. Чепурнова и др., *Регион. кровообращ. и цирк.*, **2**(38), 95 – 98 (2011).
5. Н. Н. Золотов, В. М. Креминская, Патент РФ 2485952 (2013).
6. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Часть первая., Гриф и К, Москва (2012).
7. Г. Л. Снигур, А. В. Смирнов, А. А. Спасов и др., *Вестник новых мед. технол.*, **28**(2), 169 – 173 (2011).
8. А. А. Спасов, М. П. Воронкова, Г. Л. Снигур и др., *Биомедицина*, № 3, 12 – 18 (2011).
9. А. С. Таран, Н. И. Чепляева, *Волгоград. научно-мед. журн.*, № 1, 26 – 29 (2014).
10. А. А. Spasov, N. I. Chepljaeva, *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biom. Chem.*, **8**(4), 293 – 301 (2014).
11. L. Thomas, M. Echard, E. Langkopf, et al., *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, **325**(1), 175 – 182 (2008).

Поступила 06.02.15

THE EFFECT OF A LIMIGLIDOL ON DPP-4 AND MORPHOLOGICAL FEATURES OF PANCREATIC ISLETS IN STREPTOZOTOCIN DIABETES MODEL

A. A. Spasov^{1,2}, N. I. Cheplyaeva¹, K. V. Lenskaya¹, and G. L. Snigur^{1,2}

¹ Volgograd State Medical University, pl. Pavshikh Bortsov 1, Volgograd, 400131 Russia

² Volgograd Medical Research Center, pl. Pavshikh Bortsov 1, Volgograd, 400131 Russia

The effect of limigliadol on the activity of dipeptidyl peptidase type 4 (DPP-4) *in vitro* and *in vivo* and on the morphological parameters of pancreatic islets have been investigated. Limigliadol exhibited dose-dependent inhibition of DPP-4 *in vitro*, but it was significantly lower compared to reference agents such as vildagliptin, sitagliptin, and diprotin A. After course of administration, limigliadol corrected blood glucose levels on the streptozotocin model of diabetes, but had no effect on the activity of DPP-4 and did not produce statistically significant increase in the specific number of endocrine β -cells.

Keywords: diabetes mellitus; limigliadol; dipeptidyl peptidase type 4; incretins, β -cell regeneration.