

Федеральное Агентство Научных Организаций
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт фармакологии регенеративной
медицины имени Е.Д. Гольдберга»
Общество с ограниченной ответственностью «Научно-производственная
фирма «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ»

на правах рукописи

ГОРБУНОВ ЕВГЕНИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

ИЗУЧЕНИЕ АНТИДИАБЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И МЕХАНИЗМОВ
ДЕЙСТВИЯ КОМБИНИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА, СОДЕРЖАЩЕГО
АНТИТЕЛА К БЕТА-СУБЪЕДИНИЦЕ РЕЦЕПТОРА ИНСУЛИНА И
АНТИТЕЛА К ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ СИНТАЗЕ ОКСИДА АЗОТА В
РЕЛИЗ-АКТИВНОЙ ФОРМЕ

(экспериментальное исследование)

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

кандидат медицинских наук,

Тарасов С.А.

Научный консультант:

Доктор медицинских наук, профессор,

Жданов В.В.

Томск – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	7
Актуальность.	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1.Современный взгляд на основные теории патогенеза сахарного диабета и подходы к его лечению	14
1.2.Строение инсулинового рецептора	20
1.3.Новые мишени для антидиабетических соединений	25
1.4.Препараты на основе релиз-активных форм антител	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ	38
2.1.Материал исследования	38
2.2.Методы исследования	39
2.2.1.Методы исследования антидиабетической активности на модели спонтанного сахарного диабета II типа	39
2.2.2.Методы исследования <i>in vitro</i>	42
2.2.2.1.Методы изучения способности комбинированного препарата оказывать влияние на инсулин-индуцированный захват глюкозы клетками скелетной мускулатуры человека	42
2.2.2.1.1.Метод исследования жизнеспособности клеток скелетной мускулатуры человека в присутствии водного образца	42
2.2.2.1.2.Метод исследования захвата глюкозы клетками скелетной мускулатуры человека	44
2.2.2.2.Методы изучения способности комбинированного препарата стимулировать продукцию адипонектина зрелыми адипоцитами человека	45
2.2.2.2.1.Метод исследования жизнеспособности зрелых адипоцитов человека в присутствии водного образца	45

2.2.2.2.Метод исследования продукции адипонектина зрелыми адипоцитами человека	47
2.2.2.3.Методы изучения способности комбинированного препарата активировать бета-субъединицу рецептора инсулина	49
2.2.2.3.1.Методы исследования жизнеспособности зрелых адипоцитов человека в присутствии водного образца	49
2.2.2.3.2.Метод исследования активации бета-субъединиц рецептора инсулина, экспрессированных на мембранах клеток зрелых адипоцитов человека	50
2.3.Статистическая обработка результатов.....	52
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	53
3.1.Изучение антидиабетической активности на модели спонтанного сахарного диабета II типа	53
3.1.1.Общее состояние животных.....	53
3.1.2.Содержание глюкозы в крови и влияние на секрецию инсулина ...	58
3.1.3.Содержание в крови HbA1c, гормонов и глюкагон-подобного пептида	67
3.2.Изучение механизма действия.....	72
3.2.1.Влияние на инсулин-индуцированный захват глюкозы клетками скелетной мускулатуры человека	72
3.2.2.Влияние на бета-субъединицу рецептора инсулина адипоцитов.....	74
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	82
ВЫВОДЫ.....	95
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	98

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Ат	–	антитела
АМФ	–	аденозинмонофосфат
АТФ	–	аденозинтрифосфат
ВОЗ	–	Всемирная организация здравоохранения
ГЛЮТ	–	транспортер глюкозы
ГТФ	–	гуанозинтрифосфат
ДМСО	–	диметилсульфоксид
ЖК	–	жирные кислоты
ИР	–	рецептор инсулина
ИРС	–	субстрат рецептора инсулина
ИФА	–	иммуноферментный анализ
ИФР	–	инсулиноподобный фактор роста
КМЦ	–	карбоксиметилцеллюлоза
ПГТТ	–	пероральный глюкозотолерантный тест
РА	–	релиз-активность
РАФ	–	релиз-активная форма
СД	–	сахарный диабет
Akt	–	протеинкиназа В
АМРК	–	АМФ-активируемой протеинкиназы
AUC	–	площадь под кривой
CTLA4	–	антиген 4, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами
срм	–	количество импульсов в минуту
DPP-4	–	дипептидилпептидаза-4
eNOS	–	эндотелиальная NO-синтаза
ERK	–	киназа, активируемая внеклеточными сигналами
GLP-1	–	глюкагон-подобный пептид 1
GPR	–	G-белок-сопряженный рецептор
Grb	–	белок, связывающий гормон роста

GSK3	–	киназа 3 гликогенсинтазы
HbA1c	–	гликированный гемоглобин
HLA-2	–	человеческие лейкоцитарные антигены II класса
IKK	–	ингибитор каппа бета киназы
IL	–	интерлейкин
JNK1	–	митоген-активируемая протеинкиназа 8
MAPK	–	митоген-активируемая протеинкиназа
MEK	–	MAPK/ERK киназа
MTT	–	3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид
NO	–	синтаза оксида азота
P	–	фосфат
PC1	–	гликопротеин 1 плазматической мембраны
PDK1/2	–	фосфоинозитол-зависимая протеинкиназа
PI3K	–	фосфатидилинозитол-3-киназа
PIP2	–	фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат
PIP3	–	фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат
PPAR γ	–	γ -рецепторы, активирующие пролиферацию пероксисом
PTEN	–	фосфатаза и гомолог тензина
PTP	–	протеинтирозинфосфатаза
PTP1B	–	протеинтирозинфосфатаза 1B
PTPN-22	–	протеин-тирозинфосфатаза, нерцепторный тип 22 (лимфоидная)
Raf	–	серин-треониновая протеинкиназа
Ras	–	малая ГТФаза
Shc	–	SH2-содержащий белок, связанный с коллагеном
SHIP2	–	инозитол-5'-фосфатаза 2, содержащая SH2-домен
SOCS1	–	супрессор 1 сигнальных путей, активируемых цитокинами
SOCS3	–	супрессор 3 сигнальных путей, активируемых цитокинами
SOS	–	фактор обмена гуаниновых нуклеотидов для малой ГТФазы

- STZ – стрептозоцин
- TNF α – фактор некроза опухоли альфа

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность.

Согласно прогнозам экспертов ВОЗ к 2030 году диабет займет седьмое место среди причин смерти (WHO, Fact sheet №312, Updated January 2015, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>). На территории Российской Федерации (РФ) на 01.01.2015 было зарегистрировано по обращаемости более 3,7 млн. человек с сахарным диабетом (СД) (Дедов И.И. и соавт., 2015). При этом, их реальная численность в несколько раз превышает зарегистрированную и приближается к 10-12 млн. человек (Липатов Д.В. и соавт., 2014; IDF Diabetes Atlas Seventh Edition 2015, <http://www.diabetesatlas.org/>).

СД представляет собой группу метаболических заболеваний, характеризующихся гипергликемией, к которой приводит нарушение секреции инсулина, или его действия, или сочетание обоих факторов (American Diabetes Association, Position statement: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2012). Существует несколько патогенетических процессов, вовлеченных в развитие СД. Эти процессы варьируют от аутоиммунного повреждения бета-клеток поджелудочной железы с последующим дефицитом инсулина до нарушений, которые приводят к инсулинорезистентности. В основе нарушений метаболизма белков, жиров и углеводов при диабете лежит недостаточное действие инсулина на ткани-мишени. Это в свою очередь приводит к неадекватной секреции инсулина и/или к снижению ответа тканей на действие инсулина на различных уровнях сложного сигнального пути гормона. Чаще всего оба фактора встречаются у одного и того же пациента, осложняя тем самым идентификацию, что явилось первопричиной, а что следствием (American Diabetes Association, Position statement: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2012).

Выделяют два основных типа СД: СД I типа (инсулинзависимый) и СД II типа (инсулин-независимый). Первый тип диабета встречается примерно у

5-10% пациентов с данным заболеванием и является результатом клеточно-опосредованного аутоиммунного разрушения бета-клеток поджелудочной железы. Второй тип диабета встречается примерно у 90-95% пациентов с данным заболеванием, для которого характерна инсулинорезистентность и чаще относительный нежели абсолютный дефицит инсулина (American Diabetes Association, Position statement: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2012).

СД ложится тяжелым финансовым бременем на пациентов и на систему здравоохранения государств в целом (Дедов И.И., 2013). В первую очередь, это относится к СД II типа. Распространенность и заболеваемость данным типом диабета растет во всем мире, в частности, в развивающихся странах, в сочетании с увеличением частоты ожирения и распространением западноевропейского образа жизни. СД II типа остается одной из ведущих причин сердечно-сосудистых заболеваний, слепоты, терминальной стадии почечной недостаточности, ампутаций, и госпитализаций. Более того, данный тип СД связан с повышенным риском развития рака, серьезными психическими заболеваниями, хроническими заболеваниями печени, ускорением развития артрита, а также другими причинами инвалидизации и смертельных исходов (Inzucchi S.E. et al., 2012).

Медикаментозная терапия СД II типа становится все более сложной (Inzucchi S.E. et al., 2012). Более того, в связи с расширяющимся арсеналом лекарственных препаратов, появляются некоторые опасения, связанные с их потенциальными побочными эффектами (Bolen S. et al., 2007; Bergenstal R.M. et al., 2010), а также возникают вопросы о целесообразности интенсивного контроля уровня глюкозы на фоне макроваскулярных осложнений диабета (Greenfield S. et al., 2009; Matthews D.R., Tsapas A., 2008; Skyler J.S. et al., 2009; Yudkin J.S. et al., 2011). Так, современные фармакологические подходы к лечению СД II типа состоят из нескольких основных пунктов, в основе которых прием одного или нескольких пероральных сахароснижающих препаратов, с возможностью их сочетания с инсулинотерапией (American

Diabetes Association, Position statement: Standards of Medical Care in Diabetes 2012). При этом, для сахароснижающих пероральных препаратов характерен ряд побочных эффектов, среди которых наиболее типичными являются следующие: набор веса, риск гипогликемии, побочные эффекты со стороны желудочно-кишечного тракта, развитие осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы, повышение хрупкости костной ткани. Вдобавок высокая частота приема препаратов и необходимость дополнительного обучения, а также высокая стоимость создают дополнительное неудобство при их использовании. Более того, очень часто требуется комбинированный прием препаратов, что наряду с повышением эффективности терапии, повышает риск данных осложнений (Inzucchi S.E. et al., 2012).

В связи с этим, поиск и создание новых лекарственных средств для лечения СД, сочетающих высокую безопасность и эффективность, остается важной и приоритетной задачей современного здравоохранения.

Цель исследования.

Экспериментальное изучение антидиабетической активности комбинированного препарата, содержащего антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, и исследование механизмов его действия.

Задачи исследования:

1. Изучить антидиабетическую активность комбинированного препарата, содержащего антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме в сравнении с росиглитазоном на экспериментальной модели сахарного диабета II типа.

2. Изучить антидиабетическую активность отдельных компонентов комбинированного препарата – антител к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антител к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме в сравнении с комбинированным препаратом.
3. Изучить способность комбинированного препарата, содержащего антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, оказывать влияние на инсулин-индуцированный захват глюкозы клетками скелетной мускулатуры человека.
4. Изучить способность комбинированного препарата, содержащего антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, активировать бета-субъединицу рецептора инсулина.

Научная новизна.

На экспериментальной модели сахарного диабета II типа показано, что комбинированный препарат, содержащий антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, обладает антидиабетической активностью. Впервые экспериментально доказано, что антидиабетическая активность комбинированного препарата превышает активность отдельных компонентов, входящих в его состав, и главным образом обусловлена компонентом, представляющим собой антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме.

Впервые на модели сахарного диабета II типа показано, что антидиабетическая активность комбинированного препарата, содержащего антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, сравнима с

таковой росиглитазона, перорального сахароснижающего препарата из группы тиазолидиндионов.

Впервые обнаружено, что комбинированный препарат, содержащий антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, стимулирует инсулин-индуцированный захват глюкозы клетками скелетной мускулатуры человека.

Впервые, в исследовании *in vitro* с использованием Вестерн-блоттинга, было показано, что комбинированный препарат, содержащий антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, увеличивает соотношение фосфорилированных форм бета-субъединиц рецепторов инсулина к общим формам бета-субъединиц рецепторов инсулина. Более того, было показано, что данный препарат усиливает способность инсулина повышать соотношение фосфорилированных форм бета-субъединиц рецепторов инсулина к общим формам бета-субъединиц рецепторов инсулина. Кроме того, о способности комбинированного препарата, содержащего антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, оказывать влияние на бета-субъединицу рецептора инсулина свидетельствуют впервые полученные данные о его способности повышать продукцию адипонектина зрелыми адипоцитами человека в отсутствие инсулина.

Впервые выявлено, что одной из фармакологических мишеней комбинированного препарата, содержащего антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, является бета-субъединица рецептора инсулина, являющаяся одной из основных молекул внутриклеточного сигнального пути рецептора инсулина.

Теоретическая и практическая значимость работы.

В результате проведенной работы получены экспериментальные данные об антидиабетической активности комбинированного препарата, содержащего антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, на модели СД II типа и о механизмах его действия. Выявлено, что по выраженности антидиабетического действия данный препарат не уступает такому пероральному сахароснижающему препарату, как росиглитазон. Материалы экспериментальных исследований вошли в комплект документов, представленных в Федеральную службу по надзору в сфере здравоохранения и социального развития РФ и соответствующие службы других стран с целью получения разрешения на широкое медицинское применение препарата в РФ (Регистрационное удостоверение ЛСР-007376/10).

Степень достоверности и апробация результатов.

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала с использованием современных методов и методических подходов, соответствующих поставленным задачам. Выводы, сформулированные в диссертации, подтверждены экспериментальным материалом, анализом литературы, точностью статистической обработки полученных результатов.

Основные положения диссертационной работы докладывались, обсуждались и представлялись на 48 ежегодном конгрессе европейской ассоциации по изучению диабета (Берлин, Германия, 2012); 6 конференции по исследованию лекарственных препаратов и терапии (Дубай, ОАЭ, 2013); XXI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2014); 17 Всемирном конгрессе по фундаментальной и клинической фармакологии (Кейптаун, Южная Африка, 2014); 7 Ежегодном

международном конгрессе по вопросам исследований антител (Нанкин, Китай, 2015).

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 4 в ведущих научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 120 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов, списка используемой литературы. Работа иллюстрирована 8 рисунками и 10 таблицами. Библиографический указатель включает 196 источников, из них 27 отечественных, 169 иностранных.

Работа выполнена при финансировании ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ».

Автор приносит благодарность проф., д.м.н. Эпштейну О.И. ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ» за предоставленную возможность выполнения данной работы, проф., д.б.н. Сергеевой С.А. ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ» за ценные консультации при планировании экспериментов и анализе результатов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современный взгляд на основные теории патогенеза сахарного диабета и подходы к его лечению

Сахарный диабет (СД) занимает одно из первых мест в мире среди наиболее распространенных хронических заболеваний. В ряд социально значимых заболеваний СД ставят такие его особенности, как большая частота встречаемости, высокий риск инвалидизации и смертности больных. В 2015 году по данным Международной Диабетической Федерации численность больных СД в мире составила более 415 млн. человек (IDF Diabetes Atlas Seventh Edition 2015, <http://www.diabetesatlas.org/>). Учитывая темпы распространения заболевания, согласно прогнозам экспертов ВОЗ число пациентов с диагнозом СД достигнет 592 млн. человек к 2035 году, в основном за счет больных СД II типа (Donath M.Y., 2014), а к 2040 году – 642 млн. человек (IDF Diabetes Atlas Seventh Edition 2015, <http://www.diabetesatlas.org/>). Как отражение общемировых тенденций, по состоянию на 1 января 2015г. в Российской Федерации (РФ) число больных с СД II типа, обратившихся в лечебные учреждения, составило 3,7 млн. человек (Дедов И.И. и соавт., 2015). При этом, их реальная численность в несколько раз превышает зарегистрированную и приближается к 10-12 млн. человек (Липатов Д.В. и соавт., 2014; IDF Diabetes Atlas Seventh Edition 2015, <http://www.diabetesatlas.org/>). По данным Министерства здравоохранения РФ, уровень инвалидизации по причине СД составляет 2,1 случая на 100 тыс. населения (Спасов А.А. и соавт., 2013).

СД представляет собой гетерогенную группу метаболических расстройств, которые характеризуются общим симптомом – хронической гипергликемией, а также абсолютным или относительным дефицитом продукции инсулина либо его действия (Alam U. et al., 2014).

Первый тип СД возникает из-за недостаточной продукции инсулина, связанной с клеточно-опосредованной аутоиммунной деструкцией бета-

клеток поджелудочной железы, т.е. с потерей функционально активных клеток (Никонова Т.В. и соавт., 2012; Tiwari N. et al., 2014). Ведущими звеньями в патогенезе аутоиммунного поражения является дисрегуляция иммунитета и апоптоз (Пекарева Е.В. и соавт., 2010). Примерно до 50–60% случаев СД I типа обусловлено генами HLA-2 класса (человеческие лейкоцитарные антигены II класса); остальные 40% – связаны с другими генами (инсулина, гены CTLA-4 (антиген 4, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами), PTPN-22 (протеин-тирозинфосфатаза, нерецепторный тип 22) и т.д.). Взаимное влияние резистентных и предрасполагающих к развитию заболевания генов как на этапе аутоиммунной индукции, так и в период до возникновения заболевания, обуславливают его возникновение. При этом, факторы окружающей среды также играют существенную роль в патогенезе (Титович Е.В. и соавт., 2014). Таким образом, СД I типа рассматривают как мультифакторное заболевание, при котором сочетание генетической предрасположенности с триггерами окружающей среды активирует специфические аутоиммунные процессы, приводящие к гибели бета-клеток, которое происходит волнообразно в зависимости от активности инсулина и их способности к регенерации (Пекарева Е.В. и соавт., 2010; Atkinson MA., 2012).

При СД II типа наблюдается стойкая резистентность периферических тканей к эндогенному инсулину (инсулиновая резистентность), обусловленная нарушением способности гормона стимулировать захват глюкозы клетками-мишенями (мышечная ткань, жировая ткань, ткань мозга, печень и др.) и снижать уровень глюкозы в крови (Спасов А.А. и соавт., 2013; Ткачук В.А. и соавт., 2014). Следствием инсулиновой резистентности часто является компенсаторное усиление продукции инсулина бета-клетками, что приводит в дальнейшем к истощению их секреторного потенциала (Спасов А.А. и соавт., 2013). Основными физиологическими причинами инсулиновой резистентности являются избыточная пищевая нагрузка и накопление в клетках определенных липидов и их метаболитов, слабая физическая

активность, хроническое воспаление и стресс различного генеза, включая оксидативный и «стресс эндоплазматического ретикулума» (Ткачук В.А. и соавт., 2014). Данные исследований указывают, что в основе всех указанных причин лежит, вероятнее всего, нарушение передачи сигнала от рецептора инсулина (ИР) во внутриклеточных инсулин-зависимых сигнальных каскадах (Ткачук В.А. и соавт., 2014).

Пищевая перегрузка и низкая физическая активность вызывает повышение в клетке уровня АТФ (аденозинтрифосфат) и снижение его метаболита – АМФ (аденозинмонофосфат), приводя к падению активности АМФ-зависимой протеинкиназы (АМПК). АМПК регулирует активность mTorC1 (первого белкового комплекса на основе киназы mTOR), который выступает в роли главного переключателя между катаболизмом и анаболизмом в клетке (Hardie D.G. et al., 2012; Wullschlegel S. et al., 2006). При его активации он стимулирует анаболические процессы и, как следствие, синтез белка, рост и деление клеток, липогенез и адипогенез. АМПК, посылая сигнал к mTorC1, приводит к дезактивации комплекса. Клетка переключается на режим катаболизма и утилизации имеющихся запасов или поступающих источников энергии. При физической нагрузке идет активация АМПК, которая выключает mTORC1 (Ткачук В.А. и соавт., 2014).

Следующим фактором, тесно связанным с инсулиновой резистентностью, а, следовательно, и с СД II типа, является гиперлипидемия. При этом, не совсем ясно, какое из явлений является первичным, однако данные указывают, что ожирение является причиной инсулиновой резистентности, которая, в свою очередь, ускоряет набор веса и усугубляет состояние ожирения (Isganaitis E. et al., 2005; Oppert J. et al., 1995). Интересно, что при таком патологическом ожирении жир имеет абдоминальное расположение, т.е. откладывается в клетках печени, мышц, сердца, сосудистой стенки и других органов, концентрируясь в области брюшины (Snel M. et al., 2012). Накопление жиров внутри клеток определяет степень выраженности инсулиновой резистентности (Samuel V.T. et al.,

2010), а также является той причиной, которая нарушает передачу сигнала от ИР и снижает инсулин-зависимый захват глюкозы в клетках нежировых тканей, вызывая развитие инсулиновой резистентности и СД II типа (Snel M. et al., 2012).

Аномальная активация врожденного иммунитета может быть причиной развития инсулиновой резистентности (Ткачук В.А. и соавт., 2014). Эксперименты на животных, а также данные клинических исследований показали, что повышенный уровень фактора некроза опухоли альфа (TNF α) коррелирует с инсулиновой резистентностью и снижается при понижении массы тела (Hotamisligil G. et al., 1993; Hotamisligil G.S. et al., 1995). Более того, был описан механизм, в соответствии с которым воспалительные цитокины могут нарушать сигнализацию от ИР (Aguirre V. et al., 2000). Так, воспаление зачастую связано с активацией двух внутриклеточных сигнальных каскадов (один каскад связан с активацией киназы ИКК (ингибитор каппа бета киназы), второй – запускает киназу JNK1 (митоген-активируемая протеинкиназа 8)) – они опосредуют воспалительную реакцию и фосфорилирование субстрата рецептора инсулина 1 (ИРС1), вызывая нарушение передачи сигнала от ИР. Кроме того, хемокины, продукция которых может быть усилена при голодании или дисфункции в адипоцитах, вызывают миграцию в жировую ткань макрофагов, где эти клетки становятся активированными макрофагами (Weisberg S.P. et al., 2003). Информация о воспалении от активированных клеток передается другим клеткам при помощи повышения продукции различных цитокинов, включая TNF α и интерлейкин 6 (IL-6). В случае с адипоцитами, указанные цитокины стимулируют липолиз, подавляя экспрессию белков, стабилизирующих липидные капли (Bézaire V. et al., 2009; Ranjit S. et al., 2011). В мышечных клетках цитокины также стимулируют окисление липидов, в то время как в печени они тормозят окисление липидов и усиливая липогенез (Hotamisligil G.S. et al., 2006). Таким образом, активированные макрофаги могут влиять на

межтканевой энергетический баланс, сдвигая синтез липидов из жировой ткани в печень.

Как уже было сказано выше, стресс различного генеза также является одной из причин инсулиновой резистентности. Оксидативный стресс и дисфункция митохондрий приводят к увеличенной продукции активных форм кислорода, которые активируют стресс эндоплазматического ретикулума (Appenzeller-Herzog C. et al., 2012). Как отмечено выше, в результате активируется JNK1, происходит сериновое фосфорилирование ИРС и инсулиновый каскад нарушается.

Кроме СД I и II типов выделяют гестационный СД, возникающий во время беременности, и другие специфические типы СД, обусловленные генетическими дефектами функций бета-клеток и действия инсулина, заболеваниями экзокринной части поджелудочной железы, эндокринопатией, индуцированный лекарственными препаратами или химическими веществами, инфекциями, а также необычные формы иммунологически опосредованного СД (Дедов И.И. и соавт., 2015).

К наиболее опасным последствиям СД относятся такие сосудистые осложнения, как диабетическая нефропатия и ретинопатия, поражение магистральных сосудов сердца, головного мозга, периферических сосудов нижних конечностей, которые являются главной причиной инвалидизации и смертности больных СД (Дедов И.И. и соавт., 2015).

Современная стратегия терапии СД направлена на поддержание оптимального уровня глюкозы в крови путем усиления продукции инсулина, дополнительного введения его в организм и повышения чувствительности тканей к нему, а также на профилактику и уменьшение выраженности макро- и микрососудистых осложнений (Jain S. and Saraf S., 2010).

В настоящее время спектр препаратов для лечения СД составляют следующие группы: препараты инсулина, препараты сульфонилмочевины (глибенкламид, глипизид, гликлазид, глимепирид), постпрандиальные стимуляторы секреции инсулина (репаглинид, натеглинид), агонисты

глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) (эксенатид, лираглутид), ингибиторы дипептидилпептидазы-4 (DPP-4) (ситаглиптин, вилдаглиптин, саксаглиптин), бигуаниды (метформин), агонисты γ -рецепторов, активирующих пролиферацию пероксисом (PPAR γ) (росиглитазон, пиоглитазон), ингибиторы α -глюкозидазы (акарбоза, миглитол), ингибиторы натрий-глюкозного котранспортера 2-го типа (дапаглифлозин) (Спасов А.А. и соавт., 2013; Tiwari N. et al., 2014; Jain S. and Saraf S., 2010; American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes–2014, 2014; Verspohl E.J., 2012).

Основные побочные эффекты для всех групп антидиабетических препаратов включают риск развития гипогликемии, увеличение массы тела и неблагоприятные эффекты со стороны желудочно-кишечного тракта (тошнота, рвота, диарея, кишечные колики, метеоризм) (Дедов И.И. и соавт., 2011; Inzucchi S.E. et al., 2012).

Следует отметить, что у многих больных СД монотерапия одним из антидиабетических препаратов эффективна лишь непродолжительное время и в дальнейшем не способна поддерживать стабильный уровень глюкозы, что обуславливает необходимость применения комбинированной пероральной сахароснижающей терапии уже на ранних этапах заболевания. Комбинированные схемы терапии увеличивают эффективность лечения, так как рациональная комбинация препаратов задействует разные патогенетические механизмы развития заболевания, что позволяет одновременно регулировать секрецию инсулина и повышать чувствительность периферических тканей к нему. Использование данной тактики лечения СД позволяет проводить адекватный контроль гликемии крови и предупредить развитие ранних и поздних осложнений заболевания (Дедов И.И. и соавт., 2011; Доскина Е.В., 2014).

В то же время оптимизация уже существующих подходов и разработка ранее не задействованных, с учетом данных современных научных исследований в области этиологии и патогенеза СД, позволяет считать

актуальной задачей поиск новых мишеней для создания инновационных антидиабетических соединений. Среди множества возможных мишеней особое место занимает ИР и ассоциированные с ним сигнальные пути.

1.2.Строение инсулинового рецептора

Инсулин реализует свои физиологические эффекты посредством связывания со своим рецептором, который относится к семейству рецепторов с тирозинкиназной активностью. В человеческом геноме ген ИР локализован на коротком плече 19 хромосомы (Ardon, O. et al., 2014).

Исследования структуры ИР, проведенные в 1980-1981 гг., продемонстрировали, что данный рецептор представляет собой тетрамер, который образован двумя альфа-субъединицами и двумя бета-субъединицами, соединенными дисульфидными мостиками (Ward C.W. and Lawrence M.C., 2011). ИР относится к трансмембранным гликопротеинам, альфа-субъединицы которого находятся во внеклеточной области и отвечают за связывание инсулина, а бета-субъединицы образуют внутриклеточный домен, цитоплазматическая область которого содержит тирозинкиназный домен, с помощью которого фосфорилируются внутриклеточные белки-субстраты инсулинового сигнального пути по специфическим аминокислотным остаткам тирозина (Hubbard S.R., 2013).

Связывание инсулина с альфа-субъединицами рецептора приводит к конформационным изменениям в бета-субъединицах, что, в свою очередь, стимулирует их тирозинкиназную активность, которая опосредованно запускает аутофосфорилирование бета-субъединиц по нескольким тирозиновым остаткам (Lemmon M.A. and Schlessinger J., 2010). Аутофосфорилирование влечет за собой дополнительные конформационные изменения, которые ведут к активации протеинтирозинкиназной активности рецептора. Целиком фосфорилированная по ключевым остаткам тирозина активационная петля рецептора стабилизируется в такой позиции, которая

позволяет молекулам аденозинтрифосфорной кислоты и субстрату беспрепятственно поступать к их сайтам связывания, и способствует полной реализации ферментативной активности ИР (Youngren J.F., 2007).

В отличие от большинства рецепторных тирозинкиназ, для функционирования ИР требуются дополнительные молекулы, так называемые субстраты рецептора инсулина (ИРС) (Chiu S.L. and Cline H.T., 2010). ИРС-1 и ИРС-2 широко экспрессируются в тканях млекопитающих и являются посредниками в метаболическом действии инсулина, в то время как ИРС-3 и ИРС-4 имеют ограниченное распределение в организме, и их функции еще мало изучены (Whitehead J.P., 2000; Siddle K., 2012).

Центральная роль в сигнальном каскаде ИР отводится действию серин-треониновых протеинкиназ В (Akt/ПКВ) и киназы митоген-активируемой протеинкиназы (MEK), активация которых зависит от процесса фосфорилирования ИРС-1 и ИРС-2, а также SH2-содержащего белка, связанного с коллагеном (Shc) (Siddle K., 2011).

Известно, что основные метаболические эффекты инсулина, в том числе его стимулирующее влияние на поглощение глюкозы клетками-мишенями, реализуются при помощи фосфатидилинозитол-3-киназного (PI3K)–Akt/ПКВ сигнального пути. Под действием PI3K на фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (PIP2) образуется вторичный мессенджер – фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат (PIP3), который ответственен за последующую активацию Akt/ПКВ пути. Таким образом, эффект инсулина на захват глюкозы периферическими тканями через активацию Akt/ПКВ пути осуществляется при помощи транслокации глюкозного транспортера (ГЛЮТ)-4 из цитозоля в плазматическую мембрану и дальнейшего трансмембранного переноса глюкозы в клетку (Mackenzie R.W. and Elliott V.T., 2014).

Опосредованное инсулином увеличение белкового синтеза и снижение белковой деградации происходит благодаря активации белка-мишени рапамицина млекопитающих (mTOR) (Saltiel A.R. and Kahn C.R., 2001).

Клеточный рост и дифференцировка преимущественно ассоциируются с Ras/MAPK (малая ГТФаза/митоген-активируемая протеинкиназа) путями, которые активируются преимущественно благодаря фосфорилированию адаптерных белков Shc и участвуют в регуляции экспрессии отдельных генов (см. рис. 1) (Youngren J.F., 2007; Taniguchi C.M. et al., 2006).

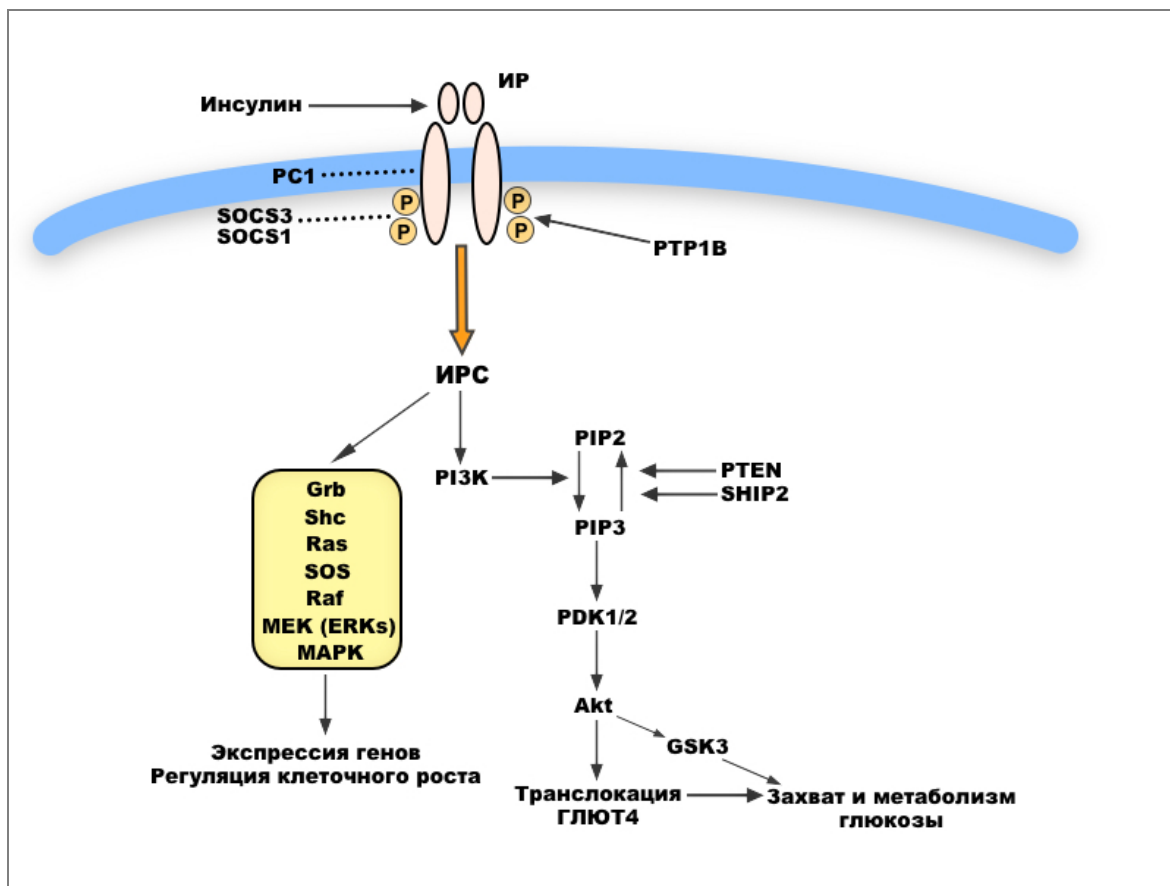


Рисунок 1 – Сигнальный каскад рецептора инсулина. Детальное описание в тексте. Обозначения: ГЛЮТ4, инсулин-зависимый транспортер глюкозы 4; ИР, инсулиновый рецептор; ИРС, субстрат рецептора инсулина; Akt, протеинкиназа B; ERK, киназа, регулируемая внеклеточными сигналами; Grb, белок, связывающий гормон роста; GSK3, киназа 3 гликогенсинтазы; MAPK, митоген-активируемая протеинкиназа; MEK, MAPK/ERK киназа; P, фосфат; PC1, гликопротеин 1 плазматической мембраны; PDK1/2, фосфоинозитол-зависимая протеинкиназа; PI3K, фосфатидинозитол-3-киназа; PIP2, фосфатидинозитол-4,5-бисфосфат; PIP3, фосфатидинозитол-3,4,5-трифосфат; PTEN, фосфатаза и гомолог тензина; PTP1B, протеинтирозинфосфатаза 1B; Raf, серин-треониновая

протеинкиназа; Ras, малая ГТФаза; Shc, SH2-содержащего белка, связанного с коллагеном; SHIP2, содержащая SH2-домен инозитол-5'-фосфатаза 2; SOCS1, SOCS 3, супрессоры 1 и 3 сигнальных путей, активируемых цитокинами; SOS, фактор обмена гуаниновых нуклеотидов для малой ГТФазы Ras (Lebecche D. et al., 2008).

Регуляция инсулинового сигнального пути осуществляется по нескольким механизмам, суть которых заключается в его модуляции в зависимости от уровня экспрессии ИР. В основном эти процессы включают или изменение содержания ИР в клетке в зависимости от уровня транскрипции и белковой деградации, или модификацию ферментативной активности отдельных рецепторов. Содержание ИР в клетке влияет на проведение сигнала от рецептора и развитие биологического ответа на связывание инсулина (Youngren J.F., 2007).

Существуют несколько механизмов негативной регуляции активности ИР (Taniguchi S.M. et al., 2006). Действие инсулина может ингибироваться благодаря действию ряда протеинтирозинфосфатаз (РТР), которые катализируют быстрое дефосфорилирование рецептора и его субстратов по остаткам фосфотирозина. Первостепенную роль в этом процессе играет цитоплазматическая фосфатаза РТР1В. У нокаутных по РТР1В мышей наблюдалось ускорение процессов фосфорилирования по тирозиновым остаткам в ИР и ИРС в скелетной мускулатуре и повышенная чувствительность к инсулину (Saltiel A.R. and Kahn C.R., 2001).

Другие белки, такие как супрессоры сигнальных путей, активируемых цитокинами (SOCS-1 и SOCS-3), белок, связывающий гормон роста 10 (Grb10), гликопротеин-1 плазматической мембраны (PC1) снижают активность ИР, блокируя его взаимодействие с субстратами или модифицируя его тирозинкиназную активность, что ведет к подавлению синтеза новых молекул рецептора («down-регуляция»). Инсулин также может стимулировать снижение количества внутриклеточных ИР, увеличивая их

интернализацию и деградацию белков, что является ключевым процессом развития инсулиновой резистентности и гиперинсулинемии (Taniguchi S.M. et al., 2006).

Альтернативный сплайсинг гена ИР у человека приводит к появлению двух изоформ рецептора – ИР-А и ИР-Б, при этом их бета-субъединицы остаются идентичными (Youngren J.F., 2007). Изоформа А преимущественно экспрессируется в пренатальном периоде, а изоформа Б – в дифференцированных тканях взрослого организма. В то время, как ИР-Б является высокоаффинным к инсулину и участвует в реализации его метаболических эффектов, ИР-А дополнительно обладает высоким сродством к инсулиноподобному фактору роста (ИФР)-2 и участвует в регуляции клеточной пролиферации (Belfiore A. et al., 2009; Heni M. et al., 2012). Повышенная экспрессия ИР-А была обнаружена в клетках злокачественных опухолей различного происхождения (Wang C.F. et al., 2013).

ИР в небольшом количестве представлены в большинстве тканей организма человека; высокая их экспрессия отмечается в таких классических мишенях для инсулина, как скелетные мышцы, печень и жировая ткань (Brunetti A. et al., 2001), где с их помощью реализуются многочисленные эффекты инсулина, описанные ниже.

Инсулин является прямым регулятором уровня гликемии крови за счет увеличения захвата глюкозы клетками мышечной и жировой ткани и подавления синтеза глюкозы в печени (Saltiel A.R. and Kahn C.R., 2001). Так как в организме мышечная ткань является основной тканью, участвующей в инсулин-индуцированной утилизации глюкозы (Liu Y. Et al., 2013), то на нее приходится около 80-85% всего захвата глюкозы в периферических тканях, в то время как на жировую ткань – только 4-5% (DeFronzo R.A., 2004). Инсулин увеличивает захват глюкозы клетками-мишенями, регулируя экзоцитоз везикул с GLUT-4 (Leto D. and Saltiel A.R.; 2013). Также он стимулирует клеточный рост и дифференцировку, способствует накоплению

субстратов в жировой ткани, печени и мышцах благодаря усилению липогенеза, синтеза гликогена и белков, и ингибированию липолиза, глюконеогенеза, гликогенолиза и белкового распада (Saltiel A.R. and Kahn C.R., 2001).

Среди современных направлений поиска антидиабетических препаратов условно можно выделить следующие: улучшение чувствительности периферических тканей к инсулину и нормализация его физиологического действия, восстановление физиологических механизмов секреции инсулина, уменьшение продукции глюкозы в печени (Спасов А.А. и соавт., 2013).

1.3. Новые мишени для антидиабетических соединений

Современный уровень научных знаний в области этиологии и патогенеза СД позволяет проводить активный поиск и разработку потенциальных мишеней для создания новых антидиабетических соединений.

В 2002 году в работе P. De Meyts и J. Whittaker были сформулированы основные мишени сигнального пути ИР, которые могут быть интересны с точки зрения разработки лекарственных средств. Так, к наиболее важным точкам приложения потенциальных антидиабетических молекул относятся внеклеточный домен ИР, тирозинкиназный домен бета-субъединиц ИР, а также различные компоненты начальных звеньев сигнального пути ИР, например РТР1В (De Meyts P. and Whittaker J., 2002).

Начиная с 1999 года, появляются публикации, посвященные поиску молекул, которые обладают потенциальной инсулиномиметической активностью и, минуя этап лиганд-рецепторного связывания, могут напрямую активировать киназу ИР (De Meyts P. and Whittaker J., 2002). Были получены данные о разработке низкомолекулярных непептидных соединений, названных активаторами ИР, которые могут восстанавливать

аутофосфорилирование ИР в инсулин-резистентных клетках. Среди них наиболее выраженный инсулиномиметический эффект показало вещество CG7 (урсоловая кислота), которое также способствовало повышению экспрессии ИР в клетках линии СНО/IR (клетки яичников китайского хомячка, экспрессирующие человеческий ИР) (Jung S.H. et al., 2007). Получены экспериментальные данные о том, что урсоловая кислота стимулирует захват глюкозы адипоцитами линии 3T3-L1, и данный антидиабетический эффект реализуется через PI3K-путь; кроме того, она усиливает транслокацию из цитозоля на поверхность клеток и экспрессию ГЛЮТ-4 (He Y. et al., 2014). Еще одним новым непептидным инсулиномиметиком является вещество 4548-G05, которое селективно активирует ИР, но не рецептор ИФР-1 или другие рецепторные тирозинкиназы. При помощи активации ИР за счет связывания 4548-G05 с внеклеточным доменом рецептора происходит запуск сигнальных путей Акт и ERK, и, как результат, стимуляция захвата глюкозы клетками. Более того, наблюдается сильный гипогликемический эффект при пероральном введении 4548-G05 интактным мышам и мышам с моделями СД I и II типов (Qiang G. et al., 2014). Производные инозитола также обладают инсулиноподобными эффектами и усиливают проведение сигнального ответа от ИР (Altaf Q.A. et al., 2014). Так, 3-*O*-метил-хироинозитол (пинитол), полученный из растения *Bougainvillea spectabilis*, снижает уровень глюкозы в крови и улучшает инсулиновую сигнализацию на различных моделях СД (Bates S.H. et al., 2000). Помимо антидиабетических свойств у пинитола также был обнаружен антигиперлипидемический эффект. При пероральном введении соединения крысам со стрептозотоцин-индуцированным (STZ-индуцированным) СД наблюдалось снижение уровня глюкозы и общего холестерина (ОХ) в крови, триглицеридов (ТГ), свободных жирных кислот (ЖК) и фосфолипидов (ФЛ) в сыворотке крови, печени, почках, сердце и мозге (Geethan P.K. and Prince P.S., 2008).

Также было установлено, что ряд неорганических солей ванадия, хрома, селена, молибдена, марганца и вольфрама проявляют инсулиномиметический эффект (Спасов А.А. и соавт., 2013). На экспериментальных моделях СД I и II типов производные ванадия продемонстрировали выраженные инсулиномиметические и антидиабетические свойства (Pillai S.I. et al., 2013), механизм которых связывают с ингибированием протеинтирозинфосфатаз, в том числе РТР1В – фермента, который участвует в дефосфорилировании ИР, провоцируя развитие инсулинорезистентности (Korbecki J. Et al., 2012). У животных с моделями СД I и II типа терапия производными ванадия приводит к стимулированию глюкозо-индуцированной секреции инсулина, увеличению поглощения глюкозы тканями и их чувствительности к инсулину, а также уменьшению продукции глюкозы печенью (Zorzano A. Et al., 2009). Однако, большинство неорганических солей ванадия обладают низкой абсорбцией из желудочно-кишечного тракта и, соответственно, требуют введения больших доз вещества, что сопровождается развитием нежелательных побочных эффектов. Поэтому с целью улучшения всасывания в желудочно-кишечном тракте и снижения токсичности были синтезированы органические комплексы ванадия (Pillai S.I. et al., 2013). Так, комплекс бис-(этилмальтолато)-оксованадия (IV) (BEOV) успешно прошел I и IIa фазы клинических испытаний (Rehder D., 2013), а на стадии доклинических исследований сильный инсулиномиметический эффект на моделях *in vivo* и *in vitro* продемонстрировали соли нового класса арилалкиламинов ванадия (Zorzano A. et al., 2009).

TLK16998 (Manchem V.P. et al., 2001) и TLK19780 (Pender C. et al., 2002) являются первыми представителями класса непептидных низкомолекулярных соединений с антидиабетической активностью, которые специфически повышают чувствительность клеток к инсулину (Lum R.T. et al., 2008). Так, представляющее собой производное полисульфоновой кислоты TLK16998 обладает способностью связываться с бета-субъединицей

ИР, что приводит к усилению его рецепторной тирозинкиназной активности и потенцированию инсулиновой сигнализации, и в результате к увеличению захвата глюкозы клетками. В исследованиях TLK16998 на модели STZ-индуцированного СД у мышей, находящихся на высокожировой диете, и мышцах с генетической моделью СД линии db/db было показано значительное снижение уровня глюкозы в крови (Altaf Q.A. et al., 2014). Антидиабетическое действие TLK19780 также связано с активацией тирозинкиназы бета-субъединицы ИР; с использованием клеточной линии адипоцитов 3T3-L1 продемонстрировано, что TLK19780 усиливает инсулин-зависимый транспорт глюкозы в клетки, увеличивая как их чувствительность, так и максимальный ответ на инсулин (Pender C. et al., 2002). С использованием в качестве основы базовой структуры TLK16998 был синтезирован целый ряд новых производных карбамидов [7-амино(2-нафтил)сульфонил]фениламина. Среди них соединение 30 являлось наиболее сильным селективным активатором тирозинкиназы ИР в тестах *in vitro*. Кроме того, данное вещество улучшало толерантность к глюкозе у гипoinsулинемических крыс и крыс со STZ-индуцированным СД (Lum R.T. et al., 2008).

Проводятся исследования молекулы 6-хлоро-6-дезоксид-1,2,3,4-тетра-О-галлоил- α -D-глюкопиранозы (6Cl-TGQ), для которой показано свойство активировать инсулиновую сигнализацию на модели клеточных культур *in vitro* и в инсулин-зависимых тканях мышей *in vivo*, индуцируя фосфорилирование ИР и активацию Akt/ПКВ пути. 6Cl-TGQ является производным природного соединения α -пента-галлоил-глюкозы (α -PGG). Было продемонстрировано, что при пероральном введении 6Cl-TGQ не только индуцирует быстрый и продолжительный захват глюкозы адипоцитами, сравнимый с действием инсулина, но и уменьшает высокий уровень гликемии крови до нормальных значений, значительно снижает уровень инсулина в плазме крови и улучшает толерантность к глюкозе у

мышей с СД 2_го типа, индуцированным высокожировой диетой (Cao Y. et al., 2014).

L-783,281 (диметиластеррихинон, DMAQ-B1 (Tsai H.J. and Chou S.Y., 2009), 2,5-дигидрокси-6-(1-метилиндол-3-yl)-3-фенил-1,4-бензохинон (Liu K. Et al., 2000)) и его аналог – соединение 2 относятся к грибковым метаболитам природного происхождения, которые являются прямыми агонистами ИР и способны активировать его как в опытах *in vitro*, так и *in vivo* (Tahrani A.A. et al., 2011). L-783,281 селективно взаимодействует с бета-субъединицей ИР, не вытесняя из него инсулин, и усиливает активность ИР тирозинкиназы. Однако, наличие гидроксихинона в структуре молекулы обуславливает ее высокую цитотоксичность, так как при контакте соединения с высокоэнергетическими электронами организма значительно повышается продукция свободных радикалов. Новое производное L-783,281 – D-410639, не содержащее в своем составе хиноновой подструктуры, является в 128 раз менее токсичным, чем исходная молекула, и по способности активировать ИР аналогично соединению 2 (Altaf Q.A. et al., 2014; Tahrani A.A. et al., 2011).

В связи с тем, что инсулинорезистентность является одним из ключевых факторов в патогенезе СД II типа, активно проводится поиск новых лекарственных препаратов, действие которых направлено на коррекцию данного дефекта (Altaf Q.A. et al., 2014).

В основе молекулярного механизма инсулинорезистентности лежит нарушение проведения сигнала от ИР из-за увеличения серинового фосфорилирования ИРС-1 в клетках органов-мишеней (скелетная мускулатура, печень, жировая ткань) (Rask-Madsen C. and Kahn C.R., 2012). При этом в разобщении инсулиновой сигнализации могут быть задействованы такие патофизиологические механизмы, как липид-зависимый механизм (увеличение концентрации эктопических липидов и их метаболитов, циркулирующих жирных кислот (ЖК)), воспалительный процесс (увеличение продукции провоспалительных цитокинов), оксидативный клеточный стресс (повышенная продукция свободных

радикалов) (Muoiio D.M. and Newgard C.B., 2008; Ткачук В.А. и Воротников А.В., 2014).

Одной из мишеней для снижения инсулинорезистентности периферических тканей являются PPAR γ , которые участвуют в регуляции метаболизма липидов и углеводов, адипогенеза, контроле воспалительных реакций и чувствительности клеток к инсулину (Бабак О.Я. и соавт., 2010). Главным образом, PPAR γ находятся в жировой ткани, где их активация способствует синтезу белков, связывающих ЖК, и транспорту их в жировую ткань. Также при активации PPAR γ происходит повышение экспрессии ГЛЮТ-2, что приводит к улучшению утилизации глюкозы в тканях, и, как следствие, снижению гликемии крови; усиливается проведение сигнала от ИР благодаря повышению его чувствительности (Karak M. Et al., 2013). Первый препарат из класса сенситайзеров инсулина, агонист PPAR γ – троглитазон, синтезированный в 80-х годах прошлого века (Sundriyal S. et al., 2008), оказался эффективным в терапии инсулинорезистентности, однако впоследствии был изъят из продажи из-за участвовавших случаев гепатотоксичности (Wang L. Et al., 2014). Несмотря на способность PPAR γ -агонистов – росиглитазона и пиоглитазона – улучшать чувствительность периферических тканей к инсулину, корректировать расстройства липидного и углеводного обмена, их применение в клинической практике сопряжено со значительным риском возникновения у пациентов инфаркта миокарда и сердечной недостаточности, увеличением массы тела, задержкой жидкости (Wang L. Et al., 2014). Еще один PPAR γ -агонист – ривоглитазон – в настоящее время проходит III фазу клинических испытаний (Koffarnus R.L. et al., 2013).

На стадии доклинических испытаний находятся сразу несколько соединений с PPAR γ -активирующей активностью. Так, для частичного агониста L312 характерно увеличение чувствительности к инсулину у мышей с генетической моделью СД линии db/db (Xie X. et al., 2015). Исследование активации PPAR γ на моделях *in vitro*, методом анализа репортерного гена

люциферазы, показало, что инсулин-сенситизирующий эффект нового производного тиазолидиндионов, частичного агониста PPAR γ – CMHX008 не уступает эффекту росиглитазона (Ming Y. et al., 2014).

Также проводится интенсивный поиск двойных агонистов PPAR α/γ , которые сочетают свойства тиазолидиндионов и фибратов, т.е. антидиабетический эффект и гиполипидемический. Результаты исследований двойного лиганда PPAR α/γ – LT175 в опытах на мышах, которые находились на высококалорийной диете, свидетельствуют о значительном снижении массы тела, размера адипоцитов и массы белой жировой ткани животных. Соединение снижает уровень глюкозы в плазме крови, ТГ, ОХ, свободных ЖК, повышает концентрацию циркулирующего адипонектина (Gilardi F. et al., 2014). Однако для последнего, к настоящему моменту, из проходивших клинические испытания глитазаров – алеглитазара клинические испытания были приостановлены на III фазе из-за повышенного риска возникновения гипогликемии, переломов, ренальной дисфункции и гастроинтестинальной геморрагии (Hedrington M.S. and Davis S.N., 2014).

Другой мишенью, с помощью которой происходит повышение чувствительности тканей к инсулину независимо от PPAR γ -активирующего механизма и ассоциированных с ним побочных эффектов, является митохондриальная мишень тиазолидиндионов (mTOT). При ее участии осуществляется контроль за течением окислительных процессов в митохондриях путем регуляции метаболизма пирувата. Эффекты, демонстрируемые соединениями-модуляторами mTOT, включают снижение инсулинорезистентности, протекцию панкреатических бета-клеток, усиление процесса окисления жирных кислот в печени и поглощения глюкозы клетками скелетной мускулатуры (Colca J.R. et al., 2014). Одним из модуляторов mTOT является соединение MSDC-0160, которое в настоящий момент проходит IIb фазу клинических испытаний (Colca J.R. et al., 2013).

При активации АМФ-активируемой протеинкиназы (АМРК), которая относится к серин-треониновым киназам и весьма чувствительна к

энергетическому запасу клетки, также выявляются инсулин-сенситизирующие эффекты, что делает ее потенциальной мишенью для терапии СД II-го типа. Благодаря активации АМПК стимулируется захват глюкозы клетками скелетных мышц, окисление ЖК в жировой ткани и уменьшается продукция глюкозы в печени. В то же время нарушение работы данного фермента выявляется при метаболическом синдроме и СД II типа. К естественным соединениям – активаторам АМПК относятся гормоны лептин и адипонектин, к натуральным активаторам – ресвератрол, берберин, α -липоевая кислота, а к фармакологическим активаторам – 5-аминоимдазол-4-карбоксамид рибозид (AICAR), бигуаниды, тиазолидиндионы, агонисты GLP-1, ингибиторы DPP-4, салицилаты и соединение A-769662 (Coughlan K.A., et al., 2014).

Еще одной привлекательной мишенью для терапии СД II типа является G-белок-сопряженный рецептор (GPR) 120, также называемый рецептором 4 к свободным ЖК (FFAR4), который играет важную роль в поддержании метаболического гомеостаза организма, модуляции чувствительности тканей к инсулину, секреции инсулина клетками поджелудочной железы и массы бета-клеток (Zhang D. and Leung P.S., 2014). Так, GPR120 – это функциональный рецептор для омега-3-полиненасыщенных ЖК, посредством которого осуществляются сильный инсулино-сенситизирующий эффект и антидиабетический эффект благодаря супрессии макрофагального воспаления тканей (Ichimura A. et al., 2014). Высокоселективный, доступный для перорального приема GPR120-агонист под шифром “cpdA” улучшает нарушенную толерантность к глюкозе, уменьшает гиперинсулинемию, снижает инсулинорезистентность и жировую инфильтрацию печени у мышей с ожирением, индуцированным высококалорийной диетой (Oh da Y. et al., 2014).

Перспективной мишенью для создания новых антидиабетических препаратов является содержащая SH2-домен инозитол-5'-фосфатаза 2 (SHIP2), которая является негативным эндогенным регулятором инсулиновой

сигнализации. Гидролизую PIP3 до PIP2, SHIP2 замедляет инсулин-индуцированную активацию Akt/PKB пути. Повышенная экспрессия SHIP2 в жировой ткани, скелетной мускулатуре и мозге наблюдается у линии мышей с СД db/db, в то время, как у нокаутных по SHIP2 мышей выявляется резистентность к развитию ожирения, индуцированному высококалорийной диетой, а также для них показано улучшение чувствительности тканей к инсулину и увеличение концентрации ГЛЮТ-4. Хотя известно несколько соединений-ингибиторов SHIP2 (AS1949490, NGD-61338, CPDA), для которых показана способность улучшать метаболизм глюкозы у животных с СД, на данном этапе исследования преимущественно посвящены молекулярному конструированию и докинг-анализу высокоселективных ингибиторов SHIP2 (Ichihara Y. et al., 2013).

К физиологическим регуляторам действия инсулина относится контроль за процессами фосфорилирования и дефосфорилирования ИР. Как уже было сказано, главную роль из всех протеинфосфатаз в процессе дефосфорилирования ИР и, соответственно, в модуляции инсулиновой сигнализации играет PTP1B (Johnson T.O. et al., 2002). Ингибирование цитоплазматической фосфатазы PTP1B является перспективным направлением поиска новых лекарственных средств для терапии СД II типа. Однако, в настоящее время большинство исследований в данном направлении ведется на уровне молекулярного конструирования и синтеза высокоселективных, доступных для перорального приема ингибиторов, и анализа зависимости между химической структурой, физико-химическими свойствами и функциональной активностью полученных соединений (Thareja S. et al., 2012).

Среди потенциальных ингибиторов PTP1B выделяют соединение JTT-551, которое находится на стадии доклинического изучения его антидиабетических свойств. Так, при пероральном введении JTT-551 у мышей с генетической моделью ожирения линии ob/ob и с СД линии db/db улучшался метаболизм глюкозы, предположительно, благодаря усилению

инсулиновой сигнализации (Fukuda S. et al., 2010). При хроническом введении JTT-551 у мышей с ожирением, индуцированным высококалорийной диетой, происходило снижение веса и нормализация метаболизма липидов и глюкозы (Ito M. et al., 2014). В результате ряда экспериментальных исследований на моделях *in vitro* выяснили, что флавоноид морин является неконкурентным ингибитором PTP1B, а также стимулирует фосфорилирование IP и активацию сигнального пути Akt/PKB; помимо указанных молекулярных эффектов морин ингибирует глюконеогенез и повышает синтез гликогена в печени (Paoli P. Et al., 2013). Имеются данные о том, что природные антидиабетические агенты, выделенные из экстракта растения *Selaginella tamariscina*, обладают ингибирующей активностью в отношении PTP1B. Так, производные селлагинеллина продемонстрировали сильный стимулирующий эффект на захват глюкозы адипоцитами линии 3T3-L1 (Nguyen P.H. et al., 2015).

Еще у нескольких природных соединений выявлены PTP1B-ингибирующие свойства: полибромистый дифенилэфир, выделенный из экстракта морской губки *Lamellodysidea herbacea* (Yamazaki H. et al.; 2013), рутамарин (Rut) (Zhang Y. et al., 2012), сафранал (Samarghandian S. et al., 2013), экстракт, полученный из растения *Annona squamosa* (Davis J.A. et al., 2012). Рутамарин стимулирует транслокацию ГЛЮТ-4 и инсулин-зависимый захват глюкозы клетками посредством ингибирования фермента PTP1B, а также способен усиливать экспрессию ГЛЮТ-4 у адипоцитов линии 3T3-L1 за счет взаимодействия с ретиноидными X рецепторами α (RXR α), агонистом которых он является. У мышей с диет-индуцированным ожирением рутамарин значительно улучшает чувствительность к инсулину и гомеостаз глюкозы (Zhang Y. et al., 2012). Подобную активность проявляет сафранал, для которого, как для ингибитора PTP1B, также характерно значительное усиление захвата глюкозы клетками посредством транслокации ГЛЮТ-4. Сафранал индуцирует лиганд-независимую активацию инсулинового сигнального каскада в культивируемых миотрубочках C2C12, а также при

длительном пероральном назначении улучшает нарушенную толерантность к глюкозе у мышей линии КК-Ау с моделью СД II типа (Maeda A. et al., 2014). При изучении сафранала на моделях *in vivo* были обнаружены антигиперлипидемический, антиоксидантный и гипогликемический эффекты, которые могут быть полезны в терапии осложнений СД (Samarghandian S. et al., 2013; Nazman O. and Ovali S., 2014).

Большое количество исследований посвящено изучению антидиабетической активности экстракта, полученного из растения *Annona squamosa*. Специфический механизм его антигипергликемического действия был изучен на модели *in vitro* в исследовании (Davis J.A. et al., 2012), результаты которого продемонстрировали, что оно связано именно с ингибированием PTP1B. На модели STZ-индуцированного СД у крыс было показано, что в механизме гипогликемического эффекта гексанового экстракта *Annona squamosa* также задействован процесс ингибирования активности α -глюкозидазы (Ranjana and Tripathi Y.B., 2014). У крыс со STZ-индуцированным СД при пероральном введении водного экстракта *Annona squamosa* наблюдалось быстрое снижение уровня глюкозы и липидов в крови, повышение активности инсулина, а также уменьшение массы тела (Shirwaikar A. et al., 2004; Kaleem M. et al., 2006). Помимо антидиабетической активности у экстракта *Annona squamosa* были обнаружены антиоксидантные свойства, которые проявлялись в увеличении активности соответствующих антиоксидантных ферментов – каталазы, супероксиддисмутазы, восстановленного глутатиона, глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы и уменьшении содержания малонового диальдегида в различных тканях крыс с моделью неинсулинзависимого СД (Gupta R.K. et al., 2008). Результаты исследований Ponarasu T. и Suguna L. продемонстрировали, что топическое использование экстракта *Annona squamosa* ускоряет заживление ран у интактных и диабетических крыс. Экстракт способствует синтезу коллагена, ускорению клеточной пролиферации, эпителизации ран, о чем свидетельствует повышение содержания дезоксирибонуклеиновой кислоты,

белка и общего коллагена в области повреждения (Ponrasu T. and Suguna L., 2012; Ponrasu T. and Suguna L., 2014).

Еще один ингибитор ISIS-PTP1B_{Rx}, который представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, в настоящее время находится на II фазе клинических испытаний (He R.J. et al.; 2014). Исследования антисмысловых нуклеотидов (ISIS-113715, ISIS-PTP1B_{Rx}; Isis Pharmaceuticals Inc., США), мишенью которых является фермент PTP1B, показали положительные результаты в перспективе контроля уровня глюкозы крови и снижения уровня липопротеинов низкой плотности у пациентов с СД II типа (по данным Isis Pharmaceuticals, <http://isispharm.com/backup/Pipeline/Therapeutic-Areas/Metabolic-Disease.htm#ISIS-PTP1BRx>).

Таким образом, в настоящее время в мировой фармацевтической индустрии существует много перспективных направлений поиска новых антидиабетических средств. Исследования в указанных областях стремительно развиваются с получением новых данных о генетическом базисе и молекулярных механизмах патогенеза СД. При этом ИР остаются важной мишенью для терапии СД, особенно СД II типа. К настоящему времени была создана группа высокоэффективных лекарственных средств, в механизм действия которых вовлекаются ИР и другие компоненты сопряженных с ним сигнальных путей. Однако, подавляющее большинство разработок прямых агонистов и сенситайзеров ИР еще находится на стадии синтеза и доклинических испытаний новых соединений.

1.4. Препараты на основе релиз-активных форм антител

К настоящему времени более 40 коммерческих терапевтических моноклональных антител доступно в США и Европе (Spiess C. et al., 2015). Однако, несмотря на их высокую популярность, использование антительных препаратов ограничено из-за отсутствия возможности перорального применения, а также проблем со стабильностью и токсичностью (Samaranayake H. et al., 2009). Поэтому большое количество исследований,

проводимых в настоящее время, сфокусировано на разработке и увеличении числа лекарственных средств, содержащих модифицированные антитела за счет использования адьювантов, модификации или инкапсулирования (Chames P. et al., 2009). Одним из предложенных подходов является технология последовательного многократного уменьшения концентрации исходного вещества (Эпштейн О.И., 2013). Было показано, что в процессе многократного последовательного уменьшения концентрации исходных антител в получаемых разведениях появляется новая активность, отсутствующая у исходной субстанции антител, названная релиз-активностью (РА), а препараты, обладающие модифицирующей активностью – релиз-активными (Эпштейн О.И., 2013). В то время как обычные препараты на основе антител нейтрализуют свои мишени, только некоторые из антительных препаратов способны имитировать эффект стимулирующего лиганда или оказывать агонистическую активность (Schmitz K.R. et al., 2009; Vonderheide R.H., 2013). Отличительной чертой релиз-активных препаратов является их способность не нейтрализовать, а модифицировать активность своей мишени (Эпштейн О.И. и соавт., 1999; Эпштейн О.И., 2008).

Для релиз-активных препаратов показана эффективность, безопасность, специфичность, дозозависимость, толерантность, а также способность оказывать действие при пероральном приеме, минуя биологические барьеры (Эпштейн О.И., 2012). Данные экспериментальных и клинических исследований доказали безопасность и эффективность препаратов данной группы для лечения заболеваний различного генеза, включая инфекционные и воспалительные заболевания, эндокринные и психические расстройства, нарушения работы мочеполовой системы (Castagne V. et al, 2008; Chu X. et al., 2008a; 2008b; Voronina T.A. et al, 2006; Dugina J.L., 2005; Tarasov S.A. et al., 2012; Эпштейн О.И. и соавт., 2005; Заплатников А.Л. и соавт., 2009; Эпштейн О.И., 2008; Матюшин Г.В., 2009; Попонина Т.М. и соавт., 2009; Багирова Г.Г., 2010; Мкртумян А.М., 2011;

Шиловский И.П. и соавт., 2012; Шиловский И.П. и соавт., 2015; Ганина К.К. и соавт., 2015; Яковлева Н.Н. и соавт., 2015).

Несмотря на то, что молекулярная природа действующего вещества еще в процессе изучения, доказанная биологическая активность препаратов на основе релиз-активных форм антител открывает двери для новых возможностей использования технологии релиз-активности.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1.Материал исследования

В экспериментальных исследованиях использовано 60 крыс-самцов линии Goto-Kakizaki (Парижская колония) в возрасте 10-12 недель массой 272-278 г, выращенных в Университете Париж Дидро (Франция). Животных содержали в неполной барьерной системе в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). Крысы находились в вентилируемых полисульфоновых клетках по 2 особи в каждой, расположенных на вентилируемых полках (IVC sealfsafe, blue line, Tecniplast France, Франция). Животные содержались при температуре воздуха 22°C и 12-часовом цикле день/ночь с искусственным циклом освещения (с 8 утра до 8 вечера), при свободном доступе к воде и гранулированному корму (рацион 113, SAVE, Villemoisson-sur-Orge, Франция). Опыты проводили в весенне-летний период, а забор материала осуществляли в утренние часы.

Изучена антидиабетическая активность и механизмы действия комбинированного препарата, содержащего антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме (РАФ Ат к бета-субъединице ИР) и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме (РАФ Ат к eNOS) (ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ», Россия). В качестве препаратов сравнения использовали росиглитазон (Interchim,

Франция – при изучении антидиабетической активности на модели спонтанного СД II типа; Sigma Aldrich, США – при изучении влияния на продукцию адипонектина зрелыми адипоцитами человека), инсулин (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Германия), РАФ Ат к бета-субъединице ИР (ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ», Россия), РАФ Ат к eNOS (ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ», Россия), РАФ Ат к каннабиноидному рецептору I типа (ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ», Россия).

Механизмы действия были изучены с использованием дифференцированных мышечных клеток человека на 5 сутки после дифференцировки, а также дифференцированных адипоцитов человека на 14 сутки после дифференцировки.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Методы исследования антидиабетической активности на модели спонтанного сахарного диабета II типа

Крысы-самцы линии Goto-Kakizaki были разделены на 6 групп методом рандомизации так, что в каждой экспериментальной группе было по 12 особей. Исходно (перед началом лечения, D0) статистически значимые межгрупповые различия в показателях массы тела животных и содержания глюкозы в плазме крови отсутствовали. Самцы были выбраны для того, чтобы избежать возможных различий между экспериментальными животными, которые могут быть связаны с гормональным репродуктивным циклом у крыс-самок.

Животным 1-й группы 1 раз в сутки (в 9:00 часов) в течение 28 суток внутрижелудочно через зонд вводили РАФ Ат к бета-субъединице ИР (ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ», Россия) в дозе 2,5 мл/кг/сутки в смеси с очищенной водой в дозе 2,5 мл/кг/сутки, так что суммарный вводимый объем составил 5 мл/кг/сутки.

Животным 2-й группы 1 раз в сутки (в 9:00 часов) в течение 28 суток внутрижелудочно через зонд вводили РАФ Ат к eNOS (ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ», Россия) в дозе 2,5 мл/кг/сутки в смеси с очищенной водой в дозе 2,5 мл/кг/сутки, так что суммарный вводимый объем составил 5 мл/кг/сутки.

Животным 3-й группы 1 раз в сутки (в 9:00 часов) в течение 28 суток внутрижелудочно через зонд в дозе 5 мл/кг/сутки вводили комбинированный препарат, содержащий РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS (ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ», Россия).

В качестве препарата сравнения животным 5-й группы 1 раз в сутки (в 9:00 часов) в течение 28 суток внутрижелудочно через зонд вводили раствор росиглитазона (каталожный номер 71740, Interchim, Франция) в дозе 5 мг/кг/сутки. Перед введением субстанцию росиглитазона смешивали с карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ) (каталожный номер 5678, Interchim, Франция), которую в свою очередь предварительно растворяли в чистой дистиллированной воде (в виде 1% раствора, т.е. 1 мг/100 мл воды). Таким образом, крысам вводили раствор росиглитазона в дозе 5 мг/кг/сутки в объеме 5 мл/кг/сутки.

Животные контрольных групп получали или очищенную воду (отрицательный контроль для препаратов на основе антител в релиз-активной форме) (группа 4) или 1,0% водный раствор КМЦ (отрицательный контроль для росиглитазона) (группа 6). Схема введения отрицательных контролей аналогичная схеме введения препаратов: 1 раз в сутки (в 9:00 часов) в течение 28 суток внутрижелудочно через зонд в дозе 5 мл/кг/сутки.

В ходе эксперимента вес (г), потребление воды (мл воды/ кг веса крысы/ сутки) и пищи (г пищи/ кг веса крысы/ сутки) оценивали на 4-е (Д4), 8-е (Д8), 12-е (Д12), 16-е (Д16), 20-е (Д20), 24-е (Д24) и 28-е (Д28) сутки.

Для измерения концентрации глюкозы, инсулина, глюкагона, лептина адипонектина, GLP-1 в плазме крови, кровь забирали, делая надрез кончика

хвоста. Взятые образцы крови центрифугировали, и плазма крови была сохранена при -20°C для проведения измерений.

Концентрацию глюкозы (анализатор глюкозы Beckman AU480, США) в плазме крови натошак оценивали на 1-е (Д1), 4-е (Д4), 8-е (Д8), 12-е (Д12), 16-е (Д16), 20-е (Д20), 24-е (Д24) и 28-е (Д28) сутки эксперимента.

Концентрацию инсулина, глюкагона, лептина, адипонектина, GLP-1 в плазме крови (все гормоны из одной аликвоты на 50 мкл) натошак оценивали на 1-е (Д1) и на 28-е (Д28) сутки эксперимента с использованием высокочувствительных ИФА наборов в соответствии с инструкцией производителя: инсулин (каталожный номер 80-INSRTUE01, ALPCO/Eurobio, Франция), глюкагон (каталожный номер YK090, AbCys/Eurobio, Франция), лептин (каталожный номер 22-LEPMS-E01, ALPCO/Eurobio, Франция), адипонектин (каталожный номер 22-ADPRT-E01, ALPCO/Eurobio, Франция), GLP-1 (каталожный номер YK160, Yanaihara Institute/AbCys, Франция).

Уровень гликированного гемоглобина (HbA1c) в цельной крови (10 мкл) оценивали до начала введения препаратов (Д0) и на 28-е (Д28) с использованием тест-системы Micromat II (каталожный номер 280-008EX, Bio-Rad Laboratories, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Для оценки изменения толерантности к глюкозе проводили пероральный глюкозотолерантный тест (ПГТТ). Тест проводили перед введением исследуемых препаратов или соответствующих контролей (Д0), в 1-е (Д1) сутки (в 12:00, т.е. через 3 часа после введения исследуемых препаратов или соответствующих контролей) и на 28-е (Д28) сутки (в 12:00, т.е. через 3 часа после введения исследуемых препаратов или соответствующих контролей). ПГТТ проводили на неанестезированных крысах, голодавших с 9:00. Животным через внутрижелудочный зонд вводили раствор глюкозы в концентрации, эквивалентной 2 г глюкозы на 1 кг веса животного. Далее производили последовательный забор образцов крови из хвостовой вены перед (0 минут) и спустя 5, 10, 15, 30, 60 и 120 минут

после введения глюкозы. Сразу после забора крови проводили измерение концентрации глюкозы в плазме, для чего использовали аликвоты объемом 10 мкл, а оставшийся объем плазмы хранили при температуре -20°C до проведения анализа по измерению концентрации инсулина, которую также определяли в ходе ПГТТ. Изменение уровня инсулина и уровня глюкозы в ПГТТ рассчитывали как интегрированные инкрементные значения содержания инсулина в плазме крови за 120 мин с момента введения глюкозы (AUC инсулина; нг/мл*мин), и как соответствующие интегрированные инкрементальные значения содержания глюкозы в крови (AUC глюкозы; г/л*мин) (сумма значений в момент времени $t_n - t_0$, где t_0 – это значение в момент времени 0 минут, а t_n – это значения в момент времени 5, 10, 15, 30, 60, 120 минут, соответственно).

2.2.2. Методы исследования *in vitro*

2.2.2.1. Методы изучения способности комбинированного препарата оказывать влияние на инсулин-индуцированный захват глюкозы клетками скелетной мускулатуры человека

2.2.2.1.1. Метод исследования жизнеспособности клеток скелетной мускулатуры человека в присутствии водного образца

Перед непосредственным изучением способности комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, оказывать влияние на инсулин-индуцированный захват глюкозы клетками скелетной мускулатуры человека, было проведено исследование жизнеспособности указанных клеток в присутствии образца воды с использованием МТТ [3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид] анализа. Целью данного анализа служила оценка максимального объема комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, который можно добавить к клеткам

и который не вызовет их неспецифическую гибель, например из-за осмотического стресса.

Для исследования были использованы *in vitro* дифференцированные мышечные клетки человека на 5 сутки после дифференцировки. Исходные миобласты человека (лот номер SLSK002, Zen-Bio, Inc., США) были получены от 3 здоровых доноров (пол: женский; возраст: $29,3 \pm 0,58$ лет; индекс массы тела: $42,7 \pm 3,4$), перенесших плановые операции и подписавших информированное согласие, в соответствии с утвержденными протоколами институционального наблюдательного совета. Клетки (полученные от нескольких доноров) были пулированы и выращены вместе, после чего собраны и заморожены как один суперлот, использованный в данном исследовании.

Миобласты человека в количестве 8000 клеток/см² засеивали в 96-луночный микропланшет CostarTM (Corning Life Sciences Plastic №3903, США), содержащий 150 мкл среды для роста клеток скелетной мышечной ткани (каталожный номер SKM-M, Zen-Bio, Inc., США). Клетки инкубировали при 37°C и 5% CO₂ пока не произойдет их 80% слияние (через 3 суток). После этого всю среду для роста клеток мышечной ткани удаляли и заменяли на 150 мкл среды для дифференцировки клеток скелетной мышечной ткани (каталожный номер SKM-D, Zen-Bio, Inc., США). Среду полностью меняли раз в два дня в течение 5 суток, по истечении которых миоциты были готовы для использования в исследовании.

В день проведения МТТ анализа среду удалили, а к клеткам добавляли или среду для дифференцировки клеток скелетной мышечной ткани (каталожный номер SKM-D, Zen-Bio, Inc., США), или же очищенную воду, разведенную в среде для дифференцировки клеток скелетной мышечной ткани (каталожный номер SKM-D, Zen-Bio, Inc., США). Содержание очищенной воды в лунке было в следующем диапазоне: 200 мкл (только очищенная вода), разведенная в 2 раза (100 мкл очищенной воды и 100 мкл среды SKM-D), разведенная в 3 раза (66 мкл очищенной воды и 134 мкл

среды SKM-D), разведенная в 4 раза (50 мкл очищенной воды и 150 мкл среды SKM-D), и 0 мкл (только среда SKM-D). Тестирование проводили в 6 повторах. Далее культуру инкубировали 72 часа во влажной камере при 37°C и 5% CO₂. После инкубации среду удаляли и заменяли на 200 мкл рабочего раствора МТТ (среда SKM-D, содержащая 1мг/мл соли МТТ). Клетки дополнительно инкубировали 2 часа при 37°C и 5% CO₂. Через 2 часа раствор МТТ удаляли и заменяли его 200 мкл 100% этанола. Клетки медленно встряхивали на планшетном шейкере при комнатной температуре 15 минут для того, чтобы растворить соль. Через 15 минут определяли абсорбцию при 570 нм с использованием микропланшетного флуориметра (SpectraMax 250: Molecular Devices).

2.2.2.1.2. Метод исследования захвата глюкозы клетками скелетной мускулатуры человека

Для оценки изменения чувствительности мышечных клеток человека к инсулину в исследовании были использованы *in vitro* дифференцированные мышечные клетки человека на 5 сутки после дифференцировки. Для проведения исследования клетки были приготовлены, как описано выше.

В микропланшет, содержащий миоциты в среде для дифференцировки клеток скелетной мышечной ткани (каталожный номер SKM-D, Zen-Bio, Inc., США), вносили или 50 мкл комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, или 50 мкл растворителя, используемого для приготовления данного препарата, т.е. очищенную воду (отрицательный контроль). Объем комбинированного препарата и отрицательного контроля, вносимого к клеткам, был выбран по результатам МТТ анализа, так как не приводил к осмотической гибели клеток. Через 72 часа клетки отделяли от сыворотки и на 4 часа помещали в старвационный буфер в присутствии вышеописанных образцов. После этого во все чашки добавили раствор инсулина (каталожный номер 11376497001, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Германия) в дозе 10 нМ. В качестве

положительных контролей использовали инсулин в концентрациях 10 нМ и 300 нМ.

Захват глюкозы инициировали добавлением смеси, содержащей 2-дезоксиглюкозу (каталожный номер G-5767, Sigma Aldrich, США) и ³H-2-дезоксиглюкозу 6,10 Ки/мМ) (каталожный номер NET328, PerkinElmer, Inc., США) (субстрат для ГЛЮТ-4). Для оценки неспецифического захвата глюкозы добавляли цитохалазин В (каталожный номер 250233, EMD Chemicals, Германия) в концентрации 10мкМ.

После инкубации в течение 2 часов клетки промывали и лизировали. Захват глюкозы измеряли по количеству импульсов/лунка (срм) с помощью сцинтилляционного счётчика 1450 Microbeta Wallac (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, США). Значения (срм), полученные для неспецифического захвата глюкозы в присутствии цитохалазина В, вычитали из значений (срм), полученных для комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, отрицательного контроля (очищенной воды), или положительных контролей (инсулин в концентрациях 10 нМ и 300 нМ), соответственно.

2.2.2.2. Методы изучения способности комбинированного препарата стимулировать продукцию адипонектина зрелыми адипоцитами человека

2.2.2.2.1. Метод исследования жизнеспособности зрелых адипоцитов человека в присутствии водного образца

Перед непосредственным изучением способности комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, активировать бета-субъединицы ИР, экспрессированных на мембранах зрелых адипоцитов человека, было проведено исследование жизнеспособности указанных клеток в присутствии образца воды с использованием МТТ анализа. Целью данного анализа служила оценка

максимального объема комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, который можно добавить к клеткам и который не вызовет их неспецифическую гибель, например из-за осмотического стресса.

Для исследования были использованы *in vitro* дифференцированные адипоциты человека через 14 суток после дифференцировки. Исходные преадипоциты человека (лот номер SL0047, Zen-Bio, Inc., США) были получены от 5 здоровых доноров (пол: женский; возраст: $47,0 \pm 5,4$ лет; индекс массы тела: $26,6 \pm 1,1$), перенесших плановые операции и подписавших информированное согласие, в соответствии с утвержденными протоколами институционального наблюдательного совета. Клетки (полученные от нескольких доноров) были пулированы и выращены вместе, после чего собраны и заморожены как один суперлот, использованный в данном исследовании.

Преадипоциты человека в количестве 40625 клеток/ cm^2 засеивали в 96-луночный микропланшет CostarTM (Corning Life Sciences Plastic №3595), содержащий 150 мкл среды для роста преадипоцитов (каталожный номер PM-1, Zen-Bio, Inc., США). Клетки инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO_2 . На следующий день всю среду для роста преадипоцитов удалили и заменили ее на 150 мкл среды для дифференцировки адипоцитов (каталожный номер DM-2, Zen-Bio, Inc., США). Далее клетки инкубировали в течение 1 недели при температуре 37°C с 5% содержанием CO_2 . По истечении 1 недели из каждой лунки удалили по 90 мкл среды для дифференцировки адипоцитов, и добавили по 120 мкл поддерживающей среда для адипоцитов (каталожный номер AM-1, Zen-Bio, Inc., США). Затем клетки инкубировали ещё в течение 1 недели при температуре 37°C во влажной камере с 5% содержанием CO_2 . После данной дополнительной недели зрелые адипоциты были готовы для использования в исследовании.

В день проведения МТТ анализа среду удалили, а к клеткам добавляли или поддерживающую среду для адипоцитов (каталожный номер AM-1, Zen-

Bio, Inc., США), или же очищенную воду, разведенную в поддерживающей среде для адипоцитов (каталожный номер AM-1, Zen-Bio, Inc., США). Содержание очищенной воды в лунке было в следующем диапазоне: 150 мкл (только очищенная вода), разведенная в 2 раза (75 мкл очищенной воды и 75 мкл среды AM-1), разведенная в 4 раза (37,5 мкл очищенной воды и 112,5 мкл среды AM-1), разведенная в 8 раз (18,75 мкл очищенной воды и 131,25 мкл среды AM-1), и 0 мкл (только среда AM-1). Тестирование проводили в 6 повторах. Далее инкубировали 72 часа во влажной камере при 37°C и 5% CO₂. После инкубации среду удаляли и заменяли на 200 мкл рабочего раствора МТТ (среда AM-1, содержащая 1 мг/мл соли МТТ). Клетки дополнительно инкубировали 2 часа при 37°C и 5% CO₂. Через 2 часа раствор МТТ удаляли и заменяли его 200 мкл 100% этанола. Клетки медленно встряхивали на планшетном шейкере при комнатной температуре 15 минут для того, чтобы растворить соль. Через 15 минут определяли оптическую плотность при 570 нм с использованием микропланшетного флуориметра (SpectraMax 250: Molecular Devices).

2.2.2.2.2. Метод исследования продукции адипонектина зрелыми адипоцитами человека

Для оценки продукции адипонектина были использованы *in vitro* дифференцированные адипоциты человека через 14 суток после дифференцировки. Для проведения исследования клетки были приготовлены, как описано выше.

Перед проведением оценки влияния на продукцию адипонектина, зрелые адипоциты человека инкубировали во влажной камере в течение трех суток при 37°C и 5% CO₂ в течение 3 суток в среде, не содержащей гормоны. После этого, зрелые адипоциты человека инкубировали во влажной камере в течение трех суток при 37°C и 5% CO₂ в присутствии 75 мкл или комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, или отрицательного контроля (очищенной воды), или

одного из неспецифических контролей (РАФ Ат к каннабиноидному рецептору I типа или РАФ кроличьей неиммунной сыворотки), или диметилсульфоксида (ДМСО). Объем комбинированного препарата, отрицательного и неспецифического контролей, добавляемого к клеткам, был выбран по результатам МТТ анализа, так как не приводил к осмотической гибели клеток. Росиглитазон (каталожный номер R2408, Sigma Aldrich, США) в концентрации 1 мкМ использовали в качестве положительного контроля.

Среду собирали через 72 часа. Уровень секреции адипонектина в питательной среде измеряли с использованием количественного твердофазного ИФА (каталожный номер ADIP-1, Zen-Bio, Inc., США) в соответствии с инструкцией производителя. Среду собирали через 72 часа. Уровень секреции адипонектина в питательной среде измеряли с использованием количественного твердофазного ИФА (каталожный номер ADIP-1, Zen-Bio, Inc., США) в соответствии с инструкцией производителя. Для этого 20 мкл собранной среды добавляли к 80 мкл раствора для предварительной обработки из ИФА набора. Образцы нагревали до температуры 100°C в течение 5 минут. После охлаждения образцов до комнатной температуры, 50 мкл каждого образца добавляли к 200 мкл буфера для разведения из ИФА набора. Образцы перемешивали и потом 100 мкл материала добавляли в закрытые лунки планшета для твердофазного ИФА. Образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После промывки к образцам добавляли вторичные антитела и далее инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Через 1 час добавляли идентифицирующие антитела, и образцы инкубировали при комнатной температуре ещё в течение 1 часа. Через 1 час добавили реагенты для выявления, и измеряли оптическую плотность при 570 нм с использованием микропланшетного флуориметра (SpectraMax 250: Molecular Devices).

2.2.2.3. Методы изучения способности комбинированного препарата активировать бета-субъединицу рецептора инсулина

2.2.2.3.1. Методы исследования жизнеспособности зрелых адипоцитов человека в присутствии водного образца

Перед непосредственным изучением способности комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, активировать бета-субъединицы ИР, экспрессированных на мембранах зрелых адипоцитов человека, было проведено исследование жизнеспособности указанных клеток в присутствии образца воды с использованием МТТ анализа. Целью данного анализа служила оценка максимального объема комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, который можно добавить к клеткам и который не вызовет их неспецифическую гибель, например из-за осмотического стресса.

Методика получения зрелых адипоцитов человека соответствует ранее описанной процедуре (смотри раздел 2.2.2.1). Методика проведения МТТ анализа также описана выше в разделе 2.2.2.1. Отличие состояло в том, что для исследования были использованы 6-луночные планшеты Cellstar® (каталожный номер 657160, Greiner Bio-One GmbH, США). Кроме того, при разведении очищенной воды в поддерживающей среде для адипоцитов (каталожный номер АМ-1, Zen-Bio, Inc., США), содержание очищенной воды в лунке варьировало в следующем диапазоне: 3 мл (только очищенная вода), разведенная в 2 раза (1,5 мл очищенной воды и 1,5 мл среды АМ-1), разведенная в 3 раза (1 мл очищенной воды и 2 мл среды АМ-1), разведенная в 4 раза (0,75 мл очищенной воды и 2,25 мл среды АМ-1), и 0 мл (только среда АМ-1).

2.2.2.3.2. Метод исследования активации бета-субъединиц рецептора инсулина, экспрессированных на мембранах клеток зрелых адипоцитов человека

Зрелые адипоциты человека инкубировали при 37°C во влажной камере с 5% содержанием CO₂ в течение трех дней в присутствии 1,5 мл или комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, или отрицательного контроля (очищенной воды), или культуральной среды для адипоцитов (каталожный номер VM-1, Zen-Bio, Inc., США). Объем комбинированного препарата и отрицательного контроля, вносимого к клеткам, был выбран по результатам МТТ анализа, так как не приводил к осмотической гибели клеток. Затем клетки выдерживали в течение 15 минут в присутствии или воды, или инсулина (каталожный номер 11376497001, Roche, Германия) в концентрации 100 нМ. Тестирование проводили в 3 повторах. Затем клетки отмывали 3 раза фосфатно-солевым буфером, охлажденным на льду (2 мл на каждую лунку). После последней промывки в каждую лунку добавляли по 250 мкл охлажденного лизирующего буфера (Tris pH 7.4, NP-40, NaCl, ингибиторы протеазы и фосфатазы; Zen-Bio, Inc., США). Клетки соскребали с планшета, а лизат на льду переносили в 1,5 мл пробирку Эппендорфа. Лизат центрифугировали при 10,000 x g в течение 10 минут при 4°C.

Для определения концентрации белка супернатанты переносили в новые пробирки и определяли концентрацию белка с помощью набора Pierce Micro BCA (каталожный номер 23235, Pierce/ThermoFisher, США) согласно инструкциям производителя. Клеточные экстракты нормализовали до концентрации белка и денатурировали путем добавления двойного объема буфера для образца NuPage LDS (каталожный номер NP0007, Invitrogen, США). Далее образцы быстро перемешивали на вортексе и центрифугировали 30 секунд при 10,000 x g, денатурировали при 75°C 5 мин, после чего центрифугировали 30 секунд при 10,000 x g.

Для проведения Вестерн блоттинга денатурированные образцы загружали на полиакридные гели NuPage (4-12%) Bis-Tris (каталожный номер NP0323Box, Invitrogen, США). Белки разделяли путем электрофореза при 200V в 1x MOPS буфере (каталожный номер NP0001, Invitrogen, США), согласно инструкциям производителя. Параллельно в полиакридные гели загружали и разделяли электрофорезом предварительно окрашенные маркеры молекулярной массы SeeBlue (каталожный номер LC5700, Invitrogen, США) для контроля продвижения электрофореза и последующего процесса переноса в нитроцеллюлозные фильтры (каталожный номер LC2001, Invitrogen, США).

После электрофореза белок переносили в нитроцеллюлозные фильтры с помощью системы переноса NuPage Transfer (Invitrogen, США). Перенос осуществлялся в 1 объеме буфера для переноса (каталожный номер NP0006, Invitrogen, США), содержащего 10% метанол, в течение 60 минут при 35V. По окончании переноса фильтры быстро (15 сек) промывали в дистиллированной воде MilliQ (EMD Millipore Corporation, США).

После промывания в дистиллированной воде MilliQ блоты блокировали на 30 минут при комнатной температуре в Трис-солевом буфере (pH 7.6), содержащем 0,1% TWEEN-20 (TBS-T) и 3% бычий сывороточный альбумин (БСА). Затем блоты, осторожно встряхивая, инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами: или с первичными антителами к бета-субъединице IP (каталожный номер 3025, Cell Signaling Technology, США), или с первичными антителами к фосфо-бета-субъединице IP (каталожный номер 3026, Cell Signaling Technology, США). После этого каждый блот промывали 3 раза по 5 минут в TBS-T и повторно блокировали 30 минут при комнатной температуре в TBS-T и 3% БСА. После блокировки блоты инкубировали 60 минут при комнатной температуре в соотношении 1:3000 с вторичными антителами (альфа-кроличьи IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (каталожный номер 7074, Cell Signaling Technology, США)). Блоты промывали ещё 3 раза по 5 минут каждый в TBS-T. После

промывания блоты инкубировали 5 минут с хемилюминесцентным субстратом согласно инструкции производителя.

С помощью установки Bio-Rad ChemiDoc station (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) получали несколько изображений при различном времени экспозиции (5-300 секунд). Количество отдельных полосок и интенсивность их окрашивания определяли согласно инструкциям Bio-Rad ChemiDoc station, оценивая размер равного прямоугольника. Сравнение образцов проводилось сначала путем определения соотношения сигнала, полученного для фосфорилированного белка, к сигналу, полученному для общего (не фосфорилированного) белка в образце, подвергающемся обработке исследуемыми соединениями. Данные показатели затем использовались для определения соотношения между контролем и исследуемыми соединениями. Определяли среднее значение величин в каждом повторе.

2.3. Статистическая обработка результатов.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрических методов статистики пакета программ Statistica 6.1 и R version: 2.13.1, RCOM server version: 2.1.

Из элементов описательной статистики вычисляли: среднее арифметическое значение (M), стандартная ошибка среднего (m). Статистическую значимость различий количественных признаков оценивали с использованием непараметрических методов (критерий Манна-Уитни, критерий Вилкоксона, однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим Tukey HSD тестом). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Изучение антидиабетической активности на модели спонтанного сахарного диабета II типа

3.1.1. Общее состояние животных

Антидиабетическую активность комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, изучали на модели спонтанного СД II типа с использованием крыс линии Goto-Kakizaki.

Все животные, включенные в исследование, дожили до его завершения. В целом, динамика массы тела животных, получавших комбинированный препарат, статистически значимо не отличалась от таковой в группе отрицательного контроля (очищенная вода) – в течение всего срока исследования животные набирали вес (таблица 1). Аналогичная картина наблюдалась в группах, получавших РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS. Исключение составляет величина показателя на 4 сутки (Д4), когда масса тела крыс, получавших комбинированный препарат, а также крыс, получавших РАФ Ат к eNOS, была ниже ($p < 0,05$), чем в отрицательном контроле (очищенная вода). Однако, это не оказало существенного влияния на общую картину, так как к концу исследования прирост по сравнению с исходными показателями (Д0) составил в среднем 13,5%, 15,6% и 14,9% в группах, получавших комбинированный препарат, РАФ Ат к eNOS, и в группе отрицательного контроля (очищенная вода), соответственно.

Потребление воды у крыс, получавших комбинированный препарат, а также отдельные компоненты, входящие в его состав (РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, соответственно) существенно не отличалось от показателей в отрицательном контроле (очищенная вода) (таблица 2). В то же время, у крыс, получавших комбинированный препарат, показатели потребления корма в 1-е (Д1) и на 28-е сутки (Д28) эксперимента оказались статистически значимо ниже, чем в группе отрицательного контроля (очищенная вода): $69,5 \pm 1,6$ г/кг/сутки против $74,9 \pm 1,7$ г/кг/сутки и $65,7 \pm 1,3$ г/кг/сутки против $71,2 \pm 1,4$ г/кг/сутки, соответственно (таблица 3). У

крыс, получавших РАФ Ат к eNOS также наблюдался сниженный по сравнению с отрицательным контролем (очищенная вода) уровень потребления корма в 1-е (Д1) сутки эксперимента ($p < 0,05$). Однако, к концу эксперимента разница невиллировалась. Потребление корма в группе, получавшей РАФ Ат к бета-субъединице ИР достоверно не отличалось от показателя в группе отрицательного контроля (очищенная вода).

Прирост массы тела у крыс, получавших росиглитазон, не отличался от данного показателя в группе соответствующего для препарата сравнения отрицательного контроля (КМЦ), составив 14,9% и 14,4%, соответственно (таблица 1). При этом, уровни потребления воды и корма, зарегистрированные на 28-й день введения росиглитазона, оказались ниже ($p < 0,01$), чем величины данного показателя в группе отрицательного контроля (КМЦ): $88,5 \pm 1,9$ мл/кг/сутки против $101,95 \pm 2,96$ мл/кг/сутки (таблица 2) и $62,5 \pm 1,3$ г/кг/сутки против $70,5 \pm 1,6$ г/кг/сутки (таблица 3), соответственно. Также стоит отметить, что вышеописанные показатели не различались в группах отрицательных контролей: у животных, получавших очищенную воду и КМЦ. Таким образом, динамика изменения веса имела схожий характер в группе комбинированного препарата и в группе препарата сравнения росиглитазона. В то же время, уровень потребления воды и пищи у крыс, получавших комбинированный препарат, был выше, чем в группе росиглитазона. Однако в среднем разница за весь период эксперимента между указанными группами составила 4,11% и 2,25% по уровню потребления воды и пищи, соответственно.

Таблица 1

Влияние исследуемых препаратов на основе антител в релиз-активной форме и росиглитазона на массу тела (г; М ± m) крыс самцов Goto-Kakizaki в течение 28-дневного введения

Исследуемые соединения	Масса тела (г)							
	Д0	Д4	Д8	Д12	Д16	Д20	Д24	Д28
Антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме	280,4±4,3	280,6±4,2	289,3±4,1 **	293,3±4,2 **	300,2±5,8 **	307,5±4,5 **	315,2±4,7 **	318,3±5,0 **
Антитела к NO-синтазе в релиз-активной форме	272,8±6,2	269,8±5,8 *##	279,4±6,0 **	287,1±6,1 **	299,1±6,4 **	301,9±6,6 **	309,8±6,3 **	314,5±6,2 **
Комбинированный препарат, содержащий антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к NO-синтазе в релиз-активной форме	277,8±3,7	275,8±3,5 *#	285,4±4,0 **	291,3±4,1 **	298,6±4,2 **	304,1±4,5 **	312,5±4,9 **	315,4±5,0 **
Отрицательный контроль (очищенная вода)	282,8±3,1	289,6±3,1 **	292,6±3,2 **	299,3±3,1 **	304,5±3,0 **	312,7±3,6 **	315,5±3,2 **	325,0±3,3 **
Росиглитазон	278,0±5,6	279,7±6,2	295,4±6,9**	298,7±6,5***	305,0±7,0**	310,5±7,1**	317,1±6,8**	321,1±6,8**
Отрицательный контроль (КМЦ)	288,5±6,2	291,3±5,3	291,3±5,6	303,8±5,4**	309,3±6,2**	317,5±6,2**	321,7±6,3**	330,1±6,2**

Примечание: Д0, Д4, Д8, Д12, Д16, Д20, Д24, Д28 – день 0 (исходно), день 4, день 8, день 12, день 16, день 20, день 24, и день 28, соответственно; КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза; отличия от значения в Д0 достоверны: * – при $p < 0,05$; ** – при $p < 0,01$; *** – при $p < 0,001$; различия с показателями отрицательного контроля (очищенная вода) достоверны: # – при $p < 0,05$; ## – при $p < 0,01$.

Таблица 2

Влияние исследуемых препаратов на основе антител в релиз-активной форме на количество потребляемой воды (мл воды/ кг веса крысы/ сутки; $M \pm m$) крысами самцов Goto-Kakizaki в течение 28-дневного введения

Исследуемые соединения	Количество потребляемой воды (мл воды/ кг веса крысы/ сутки)						
	Д4	Д8	Д12	Д16	Д20	Д24	Д28
Антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме	101,6±5,3	99,9±4,2	99,4±4,6	96,1±3,7	96,2±4,1	92,9±3,1	92,9±3,8
Антитела к NO-синтазе в релиз-активной форме	95,1±3,4	97,5±4,2	100,0±5,9	94,0±3,0	96,2±3,8	95,1±4,5	99,5±4,7
Комбинированный препарат, содержащий антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к NO-синтазе в релиз-активной форме	95,7±7,4	107,9±6,2	99,6±7,8	93,5±4,0	93,4±4,1	96,8±3,5	95,1±4,5
Отрицательный контроль (очищенная вода)	106,3±4,7	105,4±4,0	108,4±3,9	101,6±3,9	105,0±3,6	102,2±4,1	101,95±2,96
Росиглитазон	94,8±4,2	99,0±4,9	105,7±8,7&	89,4±2,2&&&	92,2±2,9&&	84,1±2,5&&&	88,5±1,9&&&
Отрицательный контроль (КМЦ)	106,3±4,7	105,4±4,0	108,4±3,9	101,6±3,9	105,0±3,6	102,2±4,1	101,95±2,96

Примечание: Д1, Д4, Д8, Д12, Д16, Д20, Д24, Д28 – день 1, день 4, день 8, день 12, день 16, день 20, день 24, и день 28, соответственно; КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза; различия с показателями отрицательного контроля (КМЦ) достоверны: & – при $p < 0,05$; && – при $p < 0,01$; &&& – при $p < 0,001$.

Таблица 3

Влияние исследуемых препаратов на количество потребляемой пищи (г пищи/ кг веса крысы/ сутки; М ± m) крысами самцов Goto-Kakizaki в течение 28-дневного введения

Исследуемые соединения	Количество потребляемой пищи (г пищи/ кг веса крысы/ сутки)						
	Д4	Д8	Д12	Д16	Д20	Д24	Д28
Антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме	71,6±1,3	73,6±1,5*	69,9±1,6*	73,6±2,2	69,2±1,3	71,0±1,4	66,9±1,2**
Антитела к NO-синтазе в релиз-активной форме	70,0±1,2#	73,0±1,4	71,6±1,3	71,7±0,8	70,1±1,3	71,1±0,8	69,2±1,0
Комбинированный препарат, содержащий антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к NO-синтазе в релиз-активной форме	69,5±1,6#	73,6±0,9**	68,8±1,8	71,7±2,3	70,8±1,7	70,8±1,3	65,7±1,3#
Отрицательный контроль (очищенная вода)	74,9±1,7	71,4±1,0*	71,4±1,8**	70,4±1,6**	72,5±2,4	71,6±1,5*	71,2±1,4*
Росиглитазон	65,7±5,0&&	76,3±1,2&&	71,3±1,5	68,4±1,1	68,4±1,7	65,0±1,3&&&	62,5±1,3&&
Отрицательный контроль (КМЦ)	75,4±1,4	67,1±4,3**	73,6±2,5	71,2±1,7*	72,7±1,9	73,0±1,2	70,5±1,6*

Примечание: Д4, Д8, Д12, Д16, Д20, Д24, Д28 – день 1, день 4, день 8, день 12, день 16, день 20, день 24, и день 28, соответственно; КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза; отличия от значения в Д4 достоверны: * – при $p < 0,05$; ** – при $p < 0,01$; различия с показателями отрицательного контроля (очищенная вода) достоверны: # – при $p < 0,05$; различия с показателями отрицательного контроля (КМЦ) достоверны: && – при $p < 0,01$; &&& – при $p < 0,001$.

3.1.2. Содержание глюкозы в крови и влияние на секрецию инсулина

Было показано, что применение комбинированного препарата в течение 28 суток предотвращает прогрессирование СД, и значительно снижает уровень глюкозы в плазме крови по сравнению как с исходными значениями (147 ± 4 дг/мл против 165 ± 3 дг/мл) ($p < 0,001$), так и с отрицательным контролем (очищенная вода) (147 ± 4 дг/мл против 165 ± 4 дг/мл) ($p < 0,01$) (таблица 4).

Стоит отметить, что выраженность антигипергликемического эффекта комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, превосходит таковой эффект компонентов, входящих в его состав (таблица 4). Ни один из отдельных компонентов комбинированного препарата не вызывал достоверного снижения уровня глюкозы в плазме крови по сравнению с отрицательным контролем (очищенная вода). Так, было показано, что введение экспериментальным животным РАФ Ат к бета-субъединице ИР в течение 28 суток также предотвращает прогрессирование СД. Однако снижение уровня глюкозы в плазме крови наблюдается только по сравнению с исходными значениями (153 ± 4 дг/мл против 168 ± 8 дг/мл) ($p < 0,001$). В группе животных, получавших РАФ Ат к eNOS, к концу лечения уровень глюкозы в плазме крови был не достоверно повышен как относительно исходных значений (167 ± 11 дг/мл против 163 ± 10 дг/мл), так и относительно отрицательного контроля (очищенная вода) (167 ± 11 дг/мл против 165 ± 4 дг/мл).

В то же время росиглитазон, в отличие от комбинированного препарата, не оказывал статистически значимого влияния на базальный уровень глюкозы в плазме крови в течение всего периода терапии по сравнению с исходными показателями. Более того, достоверное снижение уровня глюкозы по сравнению с отрицательным контролем (КМЦ) наблюдалось лишь в 1-е сутки (Д1) ($p < 0,01$) (таблица 4). Это может быть связано с тем, что сама КМЦ, которую вводили экспериментальным животным в качестве контроля для группы референсного препарата, проявила неожиданный достоверный положительный эффект в отношении содержания глюкозы в плазме крови: 186 ± 9 дг/мл в начале исследования против 149 ± 5 дг/мл в конце исследования ($p < 0,01$). Данное

наблюдение может указывать на замедленную эвакуацию веществ из полости желудка/кишечную абсорбцию из-за высокого содержания волокон. Вероятно, это послужило причиной того, что в группе, получавшей росиглитазон, статистически значимый антигипергликемический эффект, по сравнению с группой отрицательного контроля (КМЦ), отмечался лишь в 1-е сутки терапии (Д1). Тем не менее данный эффект оставался значимым ($p < 0,01$) по сравнению с группой отрицательного контроля (очищенная вода) при измерении на 28-е сутки (Д28).

Таблица 4

Влияние исследуемых препаратов на основе антител в релиз-активной форме и росиглитазона на базальный уровень глюкозы в плазме крови (натощак) (мг/дл; $M \pm m$) крыс самцов Goto-Kakizaki в течение 28-дневного введения

Исследуемые соединения	Базальный уровень глюкозы в плазме крови (мг/дл)							
	Д1	Д4	Д8	Д12	Д16	Д20	Д24	Д28
Антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме	168±8	167±8	166±8	165±7	164±6	153±5**	156±4*	153±4**
Антитела к NO-синтазе в релиз-активной форме	163±10	159±9	159±8	179±9*	169±10	159±10	167±9	167±11
Комбинированный препарат, содержащий антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к NO-синтазе в релиз-активной форме	167±3	165±4	158±5	163±5	160±7	152±5*	158±5	147±4***##
Отрицательный контроль (очищенная вода)	176±6	176±10	174±12	169±10	157±6*	162±10	165±5*	165±4*
Росиглитазон	169±3&&	154±5	156±5	153±4	148±3	150±4	151±5	145±4
Отрицательный контроль (КМЦ)	186±9	172±8	167±13	157±8**	148±5**	144±4**	155±4***	149±5**

Примечание: Д1, Д4, Д8, Д12, Д16, Д20, Д24, Д28 – день 1, день 4, день 8, день 12, день 16, день 20, день 24, и день 28, соответственно; КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза; отличия от значения в Д1 достоверны: * – при $p < 0,05$; ** – при $p < 0,01$; *** – при $p < 0,001$; различия с показателями отрицательного контроля (очищенная вода) достоверны: ## – при $p < 0,01$; различия с показателями отрицательного контроля (КМЦ) достоверны: && – при $p < 0,01$.

Результаты глюкозотолерантного теста свидетельствуют о том, что комбинированный препарат повышает чувствительность периферических тканей к глюкозе: ухудшение толерантности к глюкозе было менее выражено в группе экспериментальных животных, получавших данный препарат (рисунок 2). Так, значение AUC глюкозы в указанной группе, увеличилось всего на 17% по сравнению с исходными значениями ($p < 0,05$) (рисунок 2Г). При этом в группе, получавшей росиглитазон, значение AUC глюкозы увеличилось на 27% ($p < 0,001$) (рисунок 2Е). В тоже время, в группах отрицательных контролей (очищенная вода и КМЦ) наблюдалось существенное ($p < 0,001$) снижение толерантности к глюкозе: значения AUC глюкозы выросли на 47% и 61%, соответственно (рисунок 2А и 2Д). Рисунок 3 демонстрирует изменение толерантности к глюкозе с течением времени в разных группах. Как видно из рисунка, комбинированный препарат существенно снижал постпрандиальный уровень глюкозы по сравнению с показателями отрицательного контроля (очищенная вода): разница составила 59% ($p < 0,05$). Эффект комбинированного препарата сравним с эффектом росиглитазона, снижавшего данный показатель на 40% ($p < 0,05$) относительно соответствующего отрицательного контроля (КМЦ).

Кроме того, полученные данные позволяют сделать вывод, что способность комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, повышать чувствительность периферических тканей к глюкозе, носит более выраженный характер по сравнению с эффектами отдельных компонентов, входящих в его состав. При этом, по отдельности компоненты, входящие в состав комбинированного препарата, имели различный эффект на чувствительность периферических тканей к глюкозе. Так, в группе животных, получавших РАФ Ат к бета-субъединице ИР, значение AUC глюкозы увеличилось всего на 24% по сравнению с исходными значениями ($p < 0,05$) (рисунок 2Б), что свидетельствует о положительном эффекте на указанный параметр. Напротив, эффект РАФ Ат к eNOS был отрицательным – значение AUC

глюкозы увеличилось на 64% по сравнению с исходными значениями ($p < 0,05$), что даже выше, чем в группе отрицательного контроля (очищенная вода) (рисунок 2Б). Таким образом, из двух компонентов комбинированного препарата только РАФ Ат к бета-субъединице ИР снижал постпрандиальный уровень глюкозы по сравнению с показателями отрицательного контроля (очищенная вода): разница составила 41% ($p < 0,05$) (рисунок 3).

В целом полученные данные показывают, что комбинированный препарат оказывает положительное влияние на гомеостаз глюкозы. При этом антигипергликемическая активность комбинированного препарата опосредована, главным образом, одним компонентом – РАФ Ат к бета-субъединице ИР. Кроме того, эффект комбинированного препарата не уступает эффекту препарата сравнения.

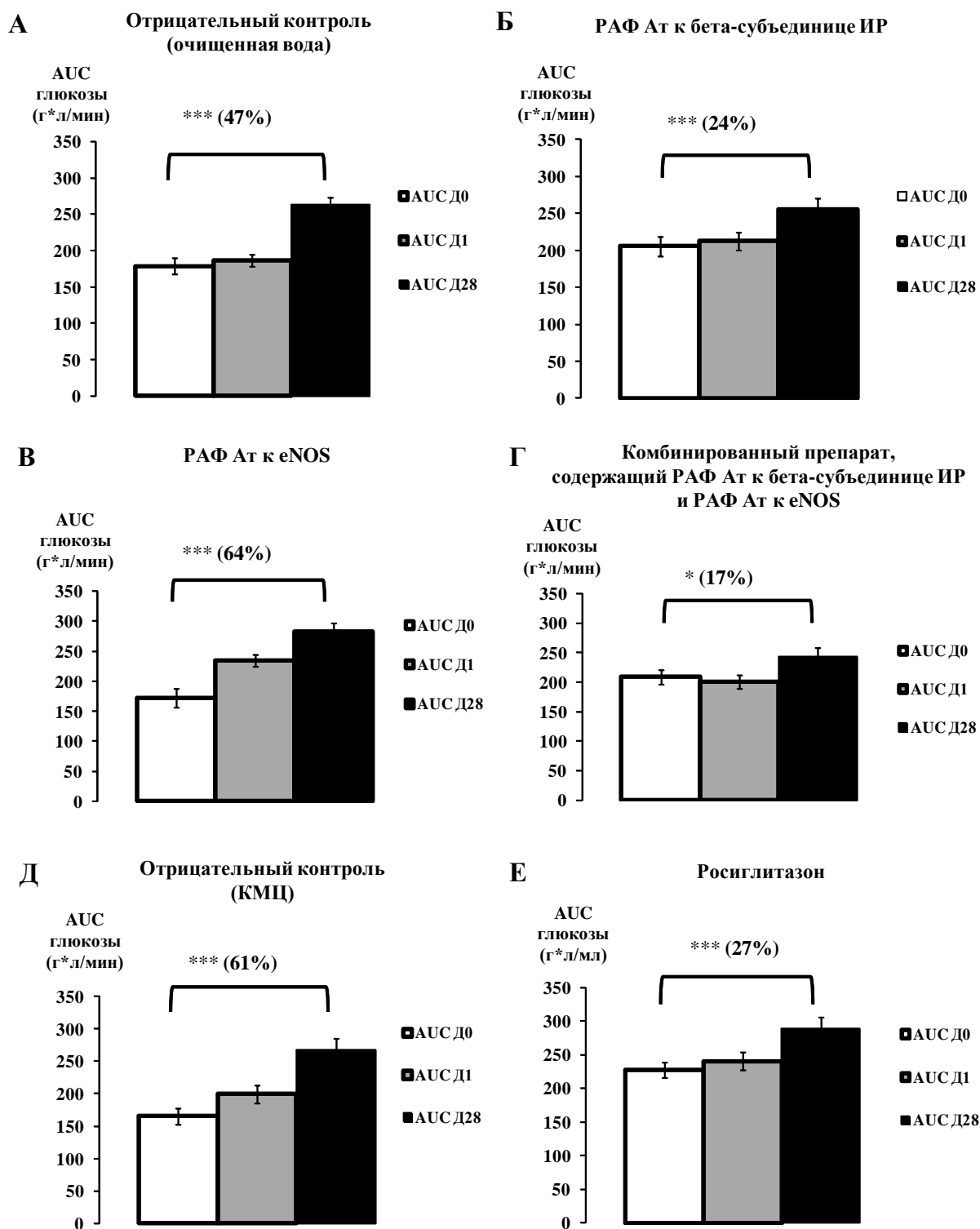


Рисунок 2 – Толерантность к глюкозе (2 г/кг п/о) у взрослых крыс-самцов линии Goto-Kakizaki с диабетом 2 типа до начала (D0), после кратковременного курса терапии (D1, 1-е сутки) и после продолжительного курса введения (D28, 28-е сутки) препаратов и соответствующих контролей. КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза; отличия от значения в D0 достоверны: * – при $p < 0,05$; ** – при $p < 0,01$; *** – при $p < 0,001$.

Разница между
AUC глюкозы
в Д28 и в Д0

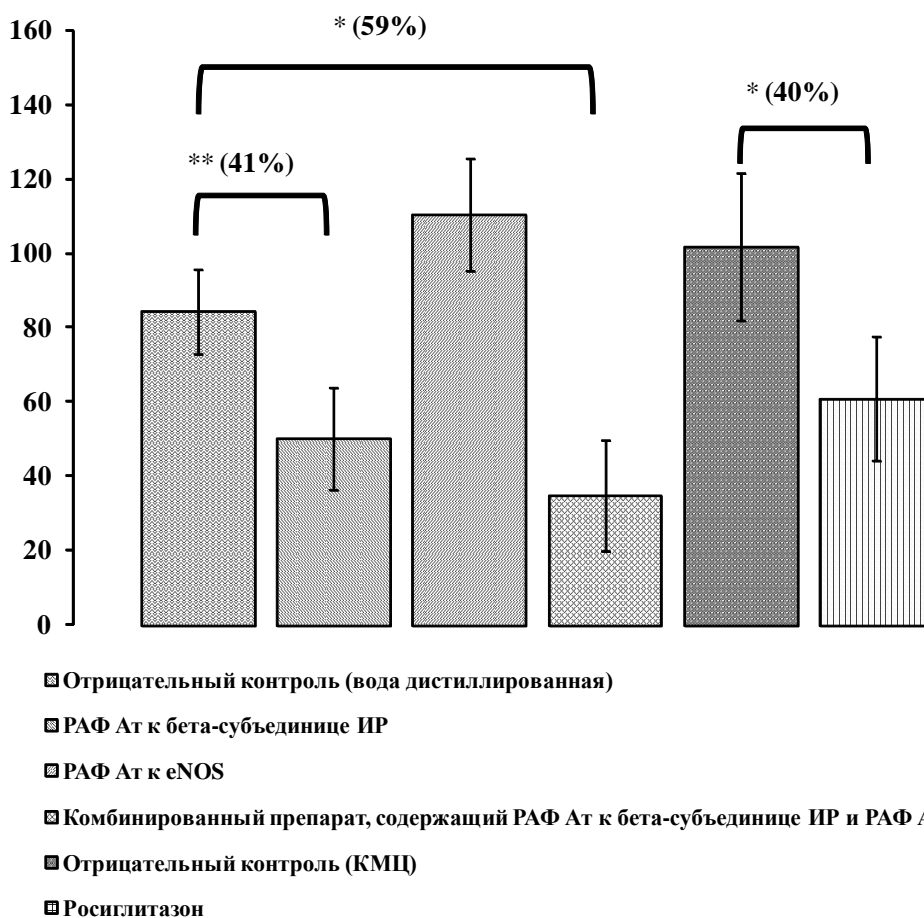


Рисунок 3 – Изменение толерантность к глюкозе у взрослых крыс-самцов линии Goto-Kakizaki с диабетом 2 типа с течением времени: разница в значениях AUC между исходными значениями (Д0) и значениями, полученными к концу терапии на 28-е сутки (Д28). КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза; различия с показателями отрицательного контроля (очищенная вода или КМЦ) достоверны: * – при $p < 0,05$; ** – при $p < 0,01$.

При этом важно отметить, что в ходе наблюдений за динамикой глюкозозависимой секреции инсулина ни комбинированный препарат, ни отдельные компоненты, входящие в его состав, не оказывали значимого влияния на выработку инсулина в ответ на пероральное введение глюкозы (рисунок 4). Только введение росиглитазона приводило к статистически значимому снижению уровня секреции инсулина на 28-е сутки (Д28) по сравнению с исходными показателями (Д0). Изменение секреции инсулина в ответ на введение глюкозы с течением времени ни для одного из

протестированных препаратов не было достоверно от соответствующих отрицательных контролей (рисунок 5).

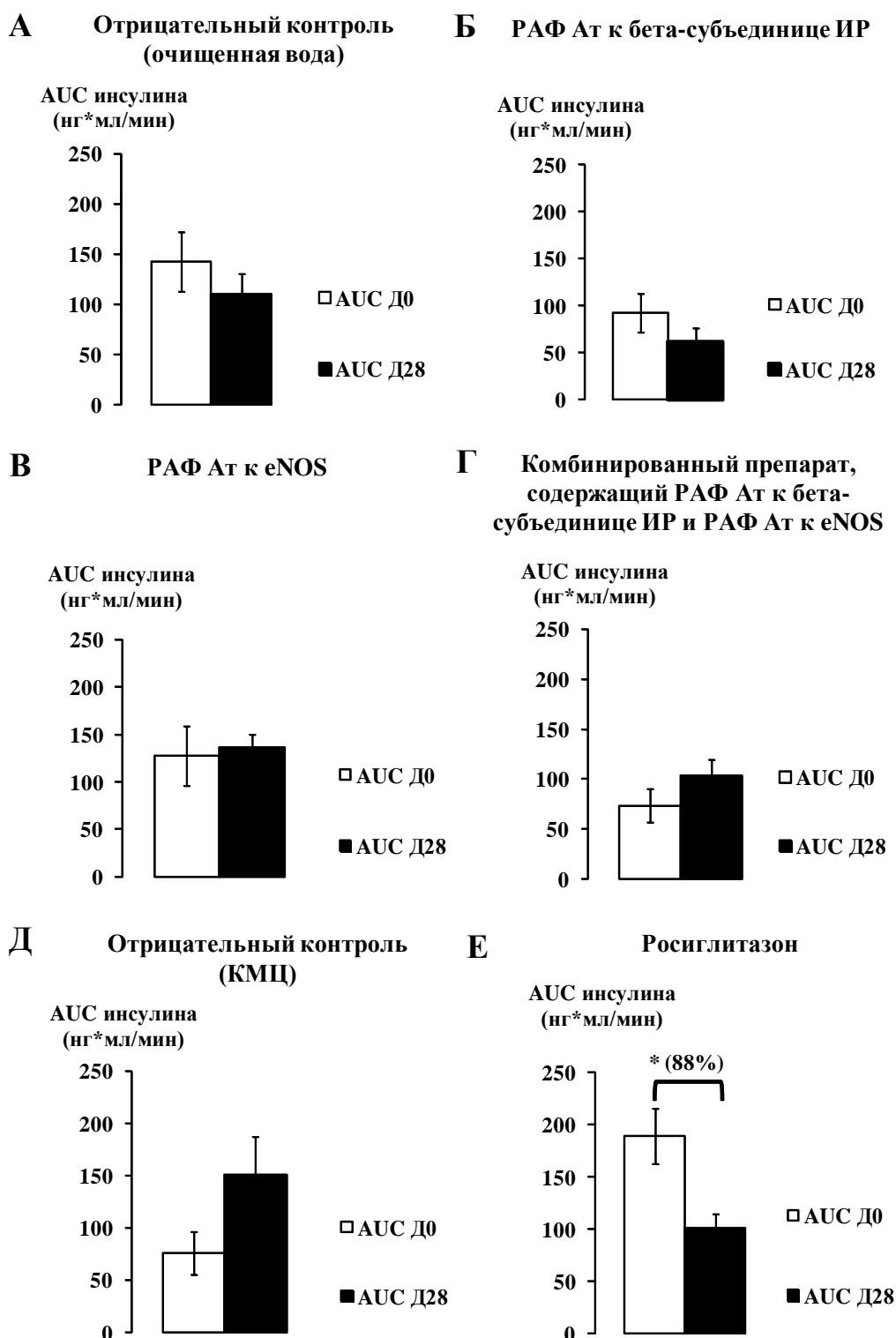


Рисунок 4 – Секреция инсулина в ответ на введение глюкозы (2 г/кг п/о) у взрослых крыс-самцов линии Goto-Kakizaki с диабетом 2 типа до начала (Д0) и после продолжительного курса введения (Д28, 28-е сутки) препаратов и соответствующих контролей. КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза; отличия от значения в Д0 достоверны: * – при $p < 0,05$.

**Разница между
AUC инсулина
в Д28 и в Д0**

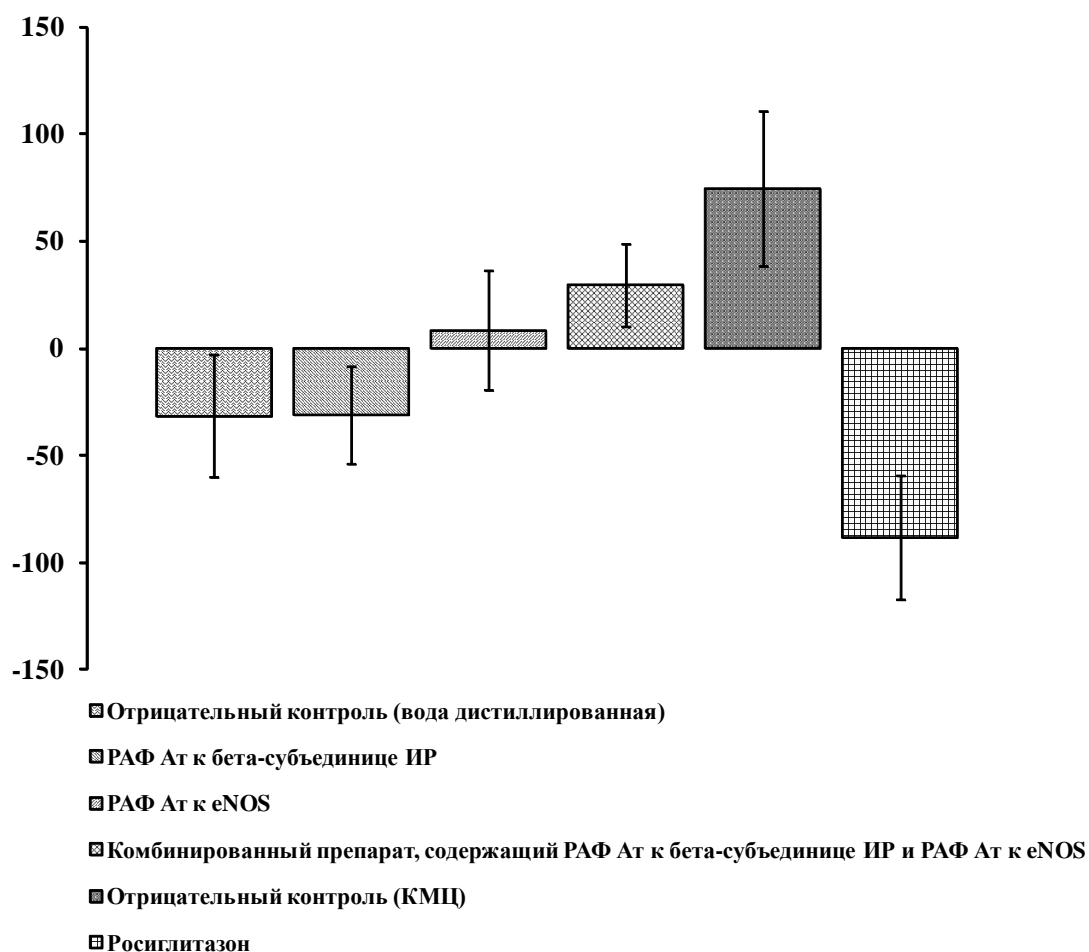


Рисунок 5 – Изменение секреции инсулина в ответ на введение глюкозы (2 г/кг п/о) у взрослых крыс-самцов линии Goto-Kakizaki с диабетом 2 типа с течением времени: разница в значениях AUC между исходными значениями (Д0) и значениями, полученными к концу терапии на 28-е сутки (Д28). КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза.

Совокупность результатов глюкозотолерантного теста и данных о секреции инсулина в ответ на нагрузку глюкозой позволяют сделать предположение, что активность комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, главным образом проявляется в инсулин-сенсibiliзирующем воздействии на ткани-мишени.

3.1.3. Содержание в крови HbA1c, гормонов и глюкагон-подобного пептида

Уровень HbA1c в цельной крови, а также концентрация инсулина, лептина, глюкагона, GLP-1 и адипонектина в плазме крови натощак у экспериментальных животных, получавших комбинированный препарат, не отличались от соответствующих показателей в отрицательном контроле (очищенная вода) (таблица 5 и таблица 6). Введение экспериментальным животным КМЦ не оказало достоверного влияния на вышеуказанные показатели по сравнению с группой, получавшей очищенную воду.

Уровень HbA1c в цельной крови у крыс в группе, получавшей комбинированный препарат, в конце эксперимента на 0,45% был ниже исходного показателя. Однако, аналогичная динамика наблюдалась и в группе отрицательного контроля (очищенная вода), где снижение составило 0,38% (таблица 5). Достоверной разницы между группами не наблюдалось. Росиглитазон хоть и повышал уровень HbA1c в цельной крови к концу эксперимента, но показатели также не достигали уровня статистической значимости ни по сравнению с исходными значениями, ни по сравнению со значениями отрицательного контроля (КМЦ).

Концентрация инсулина в плазме крови у крыс, получавших комбинированный препарат, снизилась к 28-м суткам (Д28) на 26% ($p < 0,01$) по сравнению с 1-ми сутками (Д1) (таблица 5). В то же время в группе отрицательного контроля (очищенная вода) снижение составило 25% ($p < 0,001$). Соответственно, достоверных различий между указанными группами выявлено не было. Препарат сравнения также снижал содержание гормона, уменьшив его концентрацию в плазме крови на 33% ($p < 0,05$) к концу терапии. Эффект росиглитазона также статистически значимо отличался и от показателей соответствующего отрицательного контроля как на 1-е (Д1), так и на 28-е (Д8) сутки: содержание инсулина было ниже на 45% ($p < 0,01$) и 60% ($p < 0,05$), соответственно.

К концу лечения комбинированный препарат вызывал повышение уровня GLP-1 на 15% относительно показателей в 1-е сутки эксперимента (таблица 5). Однако, как и в случае с другими измеренными гормонами плазмы крови (исключение составляет инсулин, как описано выше), данное снижение не носило статистически значимого характера ни от значений в 1-е сутки (Д1), ни от контроля, в котором уровень GLP-1 не изменился. Введение росиглитазона также не оказывало достоверного влияния на концентрацию GLP-1 в плазме крови.

Содержание лептина в плазме крови у крыс, получавших комбинированный препарат, не существенно изменялось с течением времени, и значения показателя в конце лечения практически не отличались от таковых в 1-е сутки (таблица 6). В то же время концентрация лептина, зафиксированная в 1-е (Д1) сутки терапии в плазме крыс, получавших росиглитазон, оказалась на 45% ниже ($p < 0,01$), чем в группе отрицательного контроля (КМЦ).

Введение крысам в течение 28 суток комбинированного препарата снижало уровень глюкагона в плазме крови крыс на 29% относительно показателей в 1-е сутки (Д1) (таблица 8). Напротив, в группе препарата сравнения, уровень глюкагона повысился на 39% относительно показателей в 1-е сутки (Д1). Однако, зафиксированные изменения не носили статистически значимого характера ни от значений в 1-е сутки (Д1), ни от значений в соответствующих отрицательных контролях.

Таблица 5

Влияние исследуемых препаратов на уровень HbA1c (%; $M \pm m$) в цельной крови, а также на концентрацию инсулина (нг/мл; $M \pm m$) и GLP-1 (нг/мл; $M \pm m$) в плазме крови крыс самцов Goto-Kakizaki в течение 28-дневного введения.

Исследуемые соединения	HbA1c (%)		Инсулин (нг/мл)		GLP-1 (нг/мл)	
	Д0	Д28	Д1	Д28	Д1	Д28
Антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме	8,38±0,27 ^{НД=4}	8,76±0,26	2,7±0,4	2,7±0,4	7,70±0,74#	7,24±0,49#
Антитела к NO-синтазе в релиз-активной форме	8,90±0,21	9,85±0,44*	2,8±0,4	2,7±0,4	6,10±0,77	5,42±0,66
Комбинированный препарат, содержащий антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к NO-синтазе в релиз-активной форме	9,32±0,50 ^{НД=3}	8,87±0,13	3,0±0,3	2,2±0,2**	5,70±0,44	6,56±0,61
Отрицательный контроль (очищенная вода)	9,15±0,17	8,77±0,12	3,2±0,4	2,4±0,3***	5,30±0,49	5,30±0,50
Росиглитазон	8,78±0,24	9,18±0,29	1,8±0,4&&	1,2±0,1*&	5,96±0,52	5,51±0,58
Отрицательный контроль (КМЦ)	9,30±0,21 ^{НД=6}	9,20±0,39 ^{НД=2}	4,0±0,5	2,0±0,3**	5,55±0,47	4,58±0,44

Примечание: Д0, Д1 и Д28 – день 0 (исходно), день 1 и день 28, соответственно; HbA1c – гликированный гемоглобин; КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза; GLP-1 – глюкагоноподобный пептид-1; НД – не определено (НД=2, 3, 4 или 6) – число крыс, у которых уровень HbA1c цельной крови (%) не был определен, поскольку аналитический метод оказался не эффективным, а также в силу того, что был собран недостаточный объем образцов; отличия от значения в Д0 или Д1 достоверны: * – при $p < 0,05$; ** – при $p < 0,01$; *** – при $p < 0,001$; различия с показателями отрицательного контроля (очищенная вода) достоверны: # – при $p < 0,05$; различия с показателями отрицательного контроля (КМЦ) достоверны: & – при $p < 0,05$; && – при $p < 0,01$.

Таблица 6

Влияние исследуемых препаратов на концентрацию лептина (пг/мл; $M \pm m$), глюкагона (нг/мл; $M \pm m$) и адипонектина (нг/мл; $M \pm m$) в плазме крови крыс самцов Goto-Kakizaki в течение 28-дневного введения.

Исследуемые соединения	Лептин (пг/мл)		Глюкагон (нг/мл)		Адипонектин (нг/мл)	
	Д1	Д28	Д1	Д28	Д1	Д28
Антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме	1669,2±142,9	1664,1±106,5	196,5±25,0	230,3±21,4	9539,2±529,2	9751,4±273,5
Антитела к NO-синтазе в релиз-активной форме	1437,9±86,5	1673,7±106,2 **##	242,1±29,0	184,2±19,2	10362,6±433,9	10773,3±612,5
Комбинированный препарат, содержащий антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к NO-синтазе в релиз-активной форме	1924,9±328,4	1869,8±236,4	233,0±24,3	165,3±25,5	10635,9±416,5	11133,9±567,4
Отрицательный контроль (очищенная вода)	2266,1±210,1	2125,6±254,5	199,9±20,0	202,9±21,0	10197,3±392,9	9797,8±482,0
Росиглитазон	1293,0±85,3 &&	1334,1±61,6	152,0±11,9	211,4±28,7	13816,2±507,1 &&&	14486,9±436,4 &&&
Отрицательный контроль (КМЦ)	2354,0±413,9	2034,7±307,0	205,4±29,6	232,8±49,3	9686,2±415,5	9496,3±356,0

Примечание: Д1 и Д28 – день 1 и день 28, соответственно; КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза; отличия от значения в Д1 достоверны: ** – при $p < 0,01$; различия с показателями отрицательного контроля (очищенная вода) достоверны: ## – при $p < 0,01$; различия с показателями отрицательного контроля (КМЦ) достоверны: && – при $p < 0,01$; &&& – при $p < 0,001$.

Наконец, для комбинированного препарата была показана тенденция к повышению концентрации адипонектина на 28 сутки на 13% ($p=0,07$) по сравнению со значениями в группе отрицательного контроля (очищенная вода) (таблица 8). Что же касается препарата сравнения, то в 1-е (Д1) и на 28-е (Д28) сутки эксперимента уровни адипонектина у животных данной группы были существенно выше, по сравнению с группой отрицательного контроля (КМЦ) ($p<0,001$): содержание гормона было выше на 43% и 53%, соответственно.

Таким образом, в отличие от росиглитазона, комбинированный препарат не оказывал существенного эффекта на указанные параметры крови. Напротив, эффекты росиглитазона на содержание инсулина, лептина и адипонектина отражают механизм действия препарата.

Что же касается отдельных компонентов комбинированного препарата, то введение РАФ Ат к бета-субъединице ИР приводило к увеличению количества GLP-1 в плазме крови – на 39% в 1-е (Д1) сутки терапии и на 37% – на 28-е (Д28) сутки, по сравнению с показателями в отрицательном контроле (очищенная вода) ($p<0,05$) (таблица 7). В результате введения крысам РАФ Ат к eNOS отмечалось лишь однократное достоверное ($p<0,01$) сокращение содержания лептина в плазме крови на 17% на 28-е (Д28) сутки по сравнению с группой отрицательного контроля (очищенная вода) (таблица 6). На остальные параметры отдельные компоненты комбинированного препарата, а именно РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, не оказывали статистически значимого влияния по сравнению с показателями в отрицательном контроле (очищенная вода). Так, в цельной крови у крыс, получавших РАФ Ат к eNOS, к концу терапии уровень HbA1c достоверно ($p<0,05$) повышался только относительно исходных значений. Концентрация инсулина в плазме практически не изменилась в течение 28-ми суток. Что же касается содержания остальных гормонов плазмы, то их уровень статистически значимо не изменялся даже относительно исходных показателей. Аналогичная картина наблюдалась и в группе животных,

получавших РАФ Ат к бета-субъединице ИР (таблица 5 и 6). Таким образом, в целом выраженность эффекта отдельных компонентов комбинированного препарата на указанные параметры соответствует таковой самого комбинированного препарата.

3.2. Изучение механизма действия

3.2.1. Влияние на инсулин-индуцированный захват глюкозы клетками скелетной мускулатуры человека

Результаты *in vivo* исследования антидиабетической активности комбинированного препарата позволили предположить, что препарат, вероятно, главным образом влияет на чувствительность тканей к действию инсулина.

Принимая во внимание, что утилизация глюкозы в организме осуществляется главным образом мышечной тканью, было проведено *in vitro* исследование по оценке влияния комбинированного препарата на уровень захвата глюкозы миоцитами в присутствии инсулина. В исследовании были использованы *in vitro* дифференцированные мышечные клетки человека на 5 сутки после дифференцировки.

Для оценки максимального объема комбинированного препарата, который можно добавить к клеткам и который не вызовет их неспецифическую гибель из-за осмотического стресса, перед непосредственным тестированием препарата было проведено исследование жизнеспособности указанных клеток в присутствии водного образца с использованием МТТ анализа.

Было установлено, что максимально возможный объем образца воды, использование которого не сопровождается гибелью клеток, составляет 1/2 от максимального объема образца (100 мкл), который может быть добавлен к клеткам (таблица 7).

Исследование жизнеспособности зрелых мышечных клеток человека в присутствии водного образца с использованием МТТ анализа ($M \pm m$).

Объем образца	Оптическая плотность
200 мкл	0,009±0,001
100 мкл	0,565±0,020
66 мкл	0,583±0,022
50 мкл	0,0627±0,024
0 мкл	0,647±0,018

Таким образом, в дальнейшем к клеткам добавляли 100 мкл комбинированного препарата при изучении его влияния на уровень захвата глюкозы миоцитами в присутствии инсулина.

Было показано, что уровень захват глюкозы миоцитами препаратами положительного контроля (инсулин в концентрации 10нМ и 300нМ) составил $6850,6 \pm 278,7$ срм и $9378,2 \pm 266,5$ срм (рисунок 6), соответственно. Добавление комбинированного препарата к инсулину (10нМ) на 43% ($p < 0,001$) повышало инсулинозависимый захват глюкозы миоцитами, в то время как добавление отрицательного контроля (очищенная вода) не оказывало существенного влияния: $10103,2 \pm 693,9$ срм и $6746,1 \pm 298,5$ срм, соответственно. Более того, уровень захвата глюкозы под действием инсулина (10нМ) в присутствии комбинированного препарата достигал значений, полученных для инсулина в концентрации 300нМ (рисунок 6). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что комбинированный препарат существенно повышает чувствительность тканей к инсулину, стимулируя перенос глюкозы в миоциты посредством основного ее транспортера ГЛЮТ-4.

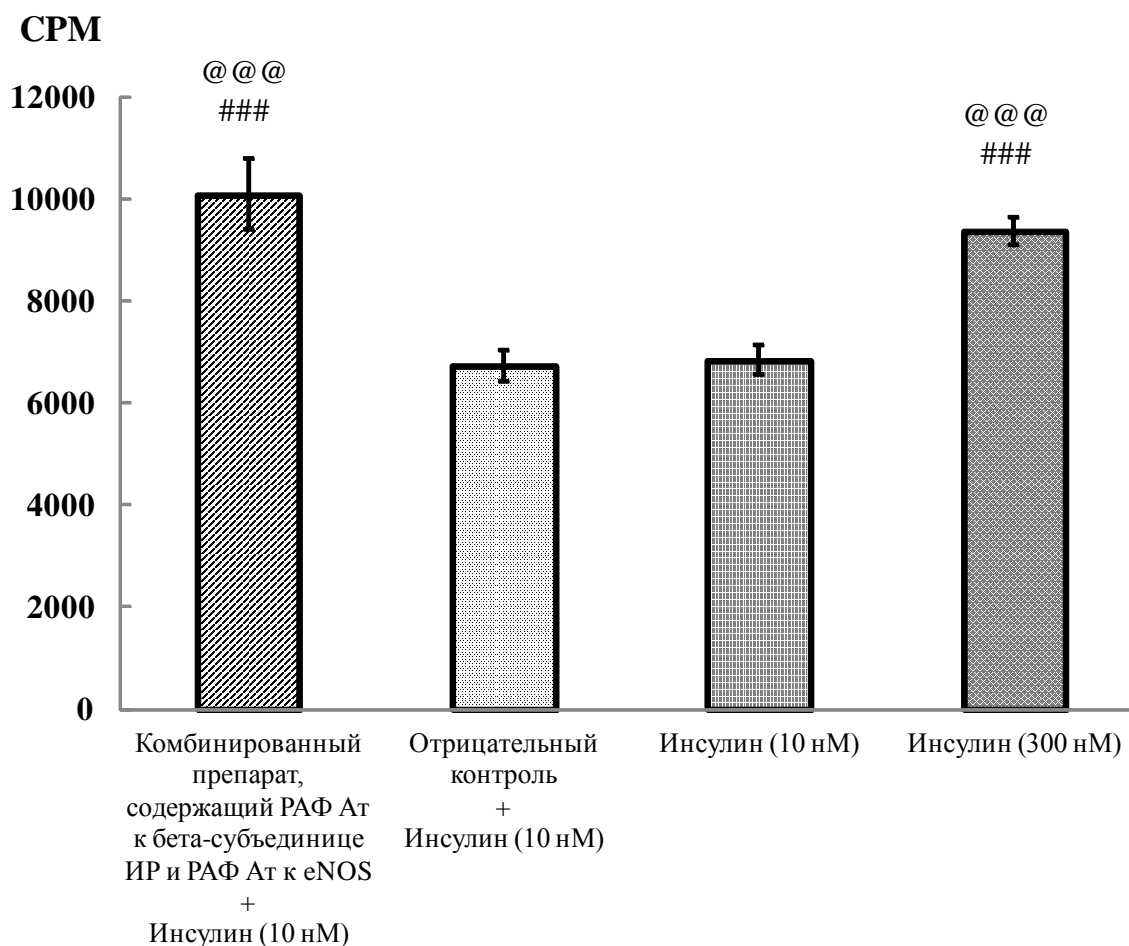


Рисунок 6 – Влияние препарата, содержащего антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, на захват глюкозы миоцитами человека в присутствии инсулина. @@@ – различия с показателями отрицательного контроля (очищенная вода) достоверны ($p < 0,001$); ### – различия с показателями положительного контроля (инсулин в дозе 10 нМ) достоверны ($p < 0,001$).

3.2.2. Влияние на бета-субъединицу рецептора инсулина адипоцитов

Для проверки гипотезы о том, что одним из основных механизмов действия комбинированного препарата является влияние на бета-субъединицу ИР, было проведено изучение его механизма действия на уровне периферических тканей: оценку способности препарата влиять на сигнальный внутриклеточный путь ИР проводили в два этапа с использованием зрелых адипоцитов человека.

Перед каждым этапом проводили исследование жизнеспособности указанных клеток в присутствии водного образца с использованием МТТ анализа для того, чтобы оценить максимальный объем комбинированного препарата, который можно добавить к клеткам и который не вызовет их неспецифическую гибель из-за осмотического стресса.

На первом этапе, оценивали способность комбинированного препарата в отсутствие инсулина влиять на секрецию адипонектина данными клетками.

Предварительно было установлено, что максимально возможный объем образца воды, использование которого не сопровождается гибелью клеток, составляет 1/2 от максимального объема образца (75 мкл), который может быть добавлен к клеткам (таблица 8).

Таблица 8

Исследование жизнеспособности зрелых адипоцитов человека в присутствии водного образца с использованием МТТ анализа ($M \pm m$)

Объем образца	Оптическая плотность
150 мкл	0,602±0,053
75 мкл	0,820±0,165
37,5 мкл	1,232±0,051
18,75 мкл	1,448±0,075
0 мкл	1,383±0,106

Таким образом, в дальнейшем к клеткам добавляли 75 мкл комбинированного препарата при изучении его влияния на секрецию адипонектина.

Инкубация зрелых адипоцитов человека в течение 72 часов вместе с комбинированным препаратом привела к статистически значимому увеличению концентрации адипонектина в культуральной среде по сравнению с показателями, полученными для других тестируемых соединений (Таблица 9).

Эффект препарата, содержащего антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, и росиглитазона на продукцию адипонектина зрелыми адипоцитами человека ($M \pm m$)

Образец	Концентрация Адипонектина (нг/мл)
Комбинированный препарат, содержащий антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме	27,97±3,08*###
Антитела к каннабиноидному рецептору I типа в релиз-активной форме	4,66±0,63
Кроличья неиммунная сыворотка в релиз-активной форме	5,18±0,28
Очищенная вода	8,73±1,59
Диметилсульфоксид (0,1%)	4,44±0,63
Росиглитазон (1 мкМ)	14,22±1,47

Примечание: * – отличия от проб с добавлением росиглитазона достоверны ($p < 0,05$); ### – отличия от проб с добавлением антител к каннабиноидному рецептору I типа в релиз-активной форме, кроличьей неиммунной сыворотки в релиз-активной форме, очищенной воды, либо диметилсульфоксида (0,1%) достоверны ($p < 0,001$).

Неспецифические контроли (РАФ Ат к каннабиноидному рецептору I типа или РАФ кроличьей неиммунной сыворотки) не оказывали достоверного влияния на секрецию адипонектина, а выраженность их эффекта была сравнима с фоновыми значениями отрицательного контроля (очищенная вода) и 0,1% ДМСО. Препарат сравнения росиглитазон стимулировал продукцию адипонектина, но выраженность эффекта была

ниже, чем эффект комбинированного препарата, а сам эффект был недостоверен по сравнению со значениями, полученными для ДМСО.

Таким образом, на данном этапе в качестве маркера влияния на бета-субъединицу ИР был выбран адипонектин. Так как культуральная среда не содержала инсулина, полученные данные позволяют предположить, что комбинированный препарат, содержащий РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, посредством прямого влияния на бета-субъединицу ИР зрелых адипоцитов человека, активирует ИР, что в свою очередь вызывает активацию сигнальных путей, ассоциированных с ИР, приводя к усилению секреции адипонектина.

На втором этапе, для подтверждения вовлеченности бета-субъединицы ИР в реализацию фармакологического действия комбинированного препарата проводили оценку влияния препарата на экспрессию белка – оценивали соотношение фосфорилированных форм бета-субъединиц ИР к общим (нефосфорилированным формам) бета-субъединиц ИР.

Предварительно было установлено, что максимально возможный объем образца воды, использование которого не сопровождается гибелью клеток, составляет 1/2 от максимального объема образца (1,5 мл), который может быть добавлен к клеткам (таблица 10).

Исследование жизнеспособности зрелых адипоцитов человека в присутствии водного образца с использованием МТТ анализа ($M \pm m$)

Объем образца	Оптическая плотность
3,0 мл	0,098±0,003
1,5 мл	1,248±0,035
1,0 мл	1,282±0,087
0,75 мл	1,278±0,021
0 мл	1,447±0,024

Таким образом, в дальнейшем к клеткам добавляли 1,5 мл комбинированного препарата при изучении его влияния на экспрессию белка. Для этого зрелые адипоциты человека инкубировали в течение 72 часов в присутствии или препарата, или отрицательного контроля (очищенная вода), или культуральной среды. После этого клетки выдерживали в течение 15 минут в присутствии или воды, или инсулина (100 нМ).

Методом Вестерн-блоттинга было показано, что комбинированный препарат, содержащий РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, в культуральной среде, не содержащей инсулин, увеличивает соотношение фосфорилированных форм бета-субъединиц ИР к общим формам бета-субъединиц ИР (рисунок 7).

**Соотношение
Ф-бета-ИР / бета-ИР
(отн.ед.)**

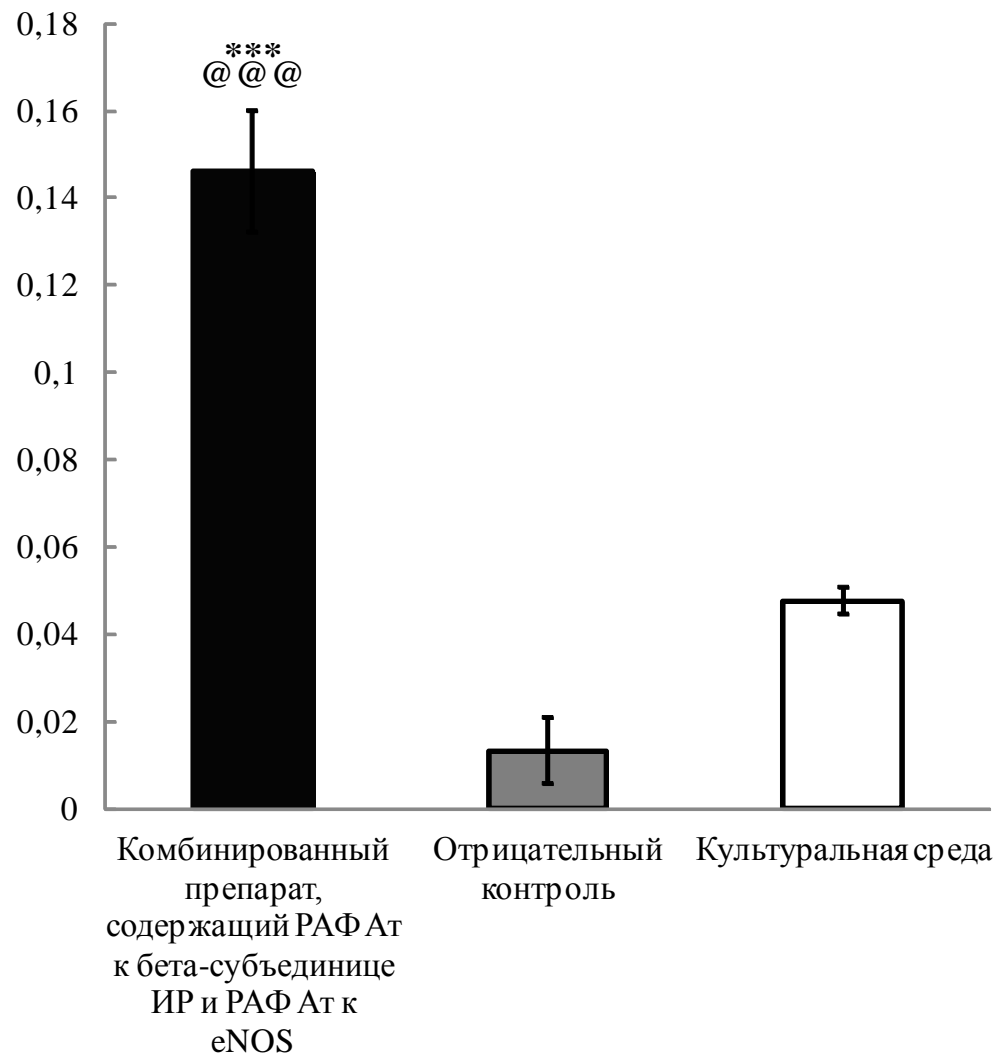


Рисунок 7 – Влияние препарата, содержащего антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, на соотношение фосфорилированных форм бета-субъединиц рецептора инсулина (Ф-бета-ИР) к общим формам бета-субъединиц рецептора инсулина (бета-ИР), экспрессируемых на мембранах зрелых адипоцитов человека в среде, не содержащей инсулин. *** – отличия от контроля (культуральная среда) достоверны ($p < 0,001$); @@@ – отличия от отрицательного контроля (очищенная вода) достоверны ($p < 0,001$).

Такое соотношение рассчитывали на основании интенсивностей окрашивания индивидуальных полос, измеренных после добавления или комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, или контролей (культуральная среда или очищенная вода).

Среднее значение соотношения фосфорилированных форм бета-субъединиц ИР к общим формам бета-субъединиц ИР для комбинированного препарата достоверно ($p < 0,001$) превышали значения, полученные как для контроля (культуральная среда), так и для отрицательного контроля (очищенная вода), и составило $0,146 \pm 0,014$ относительных единиц против $0,048 \pm 0,003$ и против $0,013 \pm 0,007$ относительных единиц, соответственно.

Кроме того, полученные данные свидетельствуют о том, что комбинированный препарат усиливает способность инсулина повышать соотношение фосфорилированных форм бета-субъединиц ИР к общим формам бета-субъединиц ИР (рисунок 8). Так, добавление инсулина (100 нМ) к зрелым адипоцитам человека, предварительно обработанным данным препаратом, вызывает статистически значимое ($p < 0,001$) повышение оцениваемого параметра по сравнению с аналогичными значениями, полученными для адипоцитов, которые подвергались предварительной обработкой культуральной средой или отрицательным контролем (очищенная вода): интенсивность составила $0,359 \pm 0,004$ относительных единиц против $0,194 \pm 0,006$ относительных единиц и против $0,081 \pm 0,005$ относительных единиц, соответственно.

Отрицательный контроль (очищенная вода) оказывал негативный эффект на соотношение фосфорилированных форм бета-субъединиц ИР к общим формам бета-субъединиц ИР в присутствии инсулина (100 нМ) ($p < 0,001$ по сравнению с показателем «культуральная среда + инсулин»): интенсивность составила $0,081 \pm 0,005$ относительных единиц против $0,194 \pm 0,006$ относительных единиц, соответственно. Известно, что изменение ионной силы раствора изменяет белок-белковое взаимодействие за счет влияния на соответствующие электростатические константы (Sheinerman FB et al., 2000; Selzer T and Schreiber G, 1999). Данное негативное влияние на белок-белковое взаимодействие может быть причиной того, что добавление отрицательного контроля (очищенной воды) вызвало ухудшение активации рецептора под действием инсулина. Поэтому, именно данный отрицательный

контроль был использован в исследовании в качестве контроля для комбинированного препарата – это именно тот же растворитель, что был использован для приготовления комбинированного препарата.

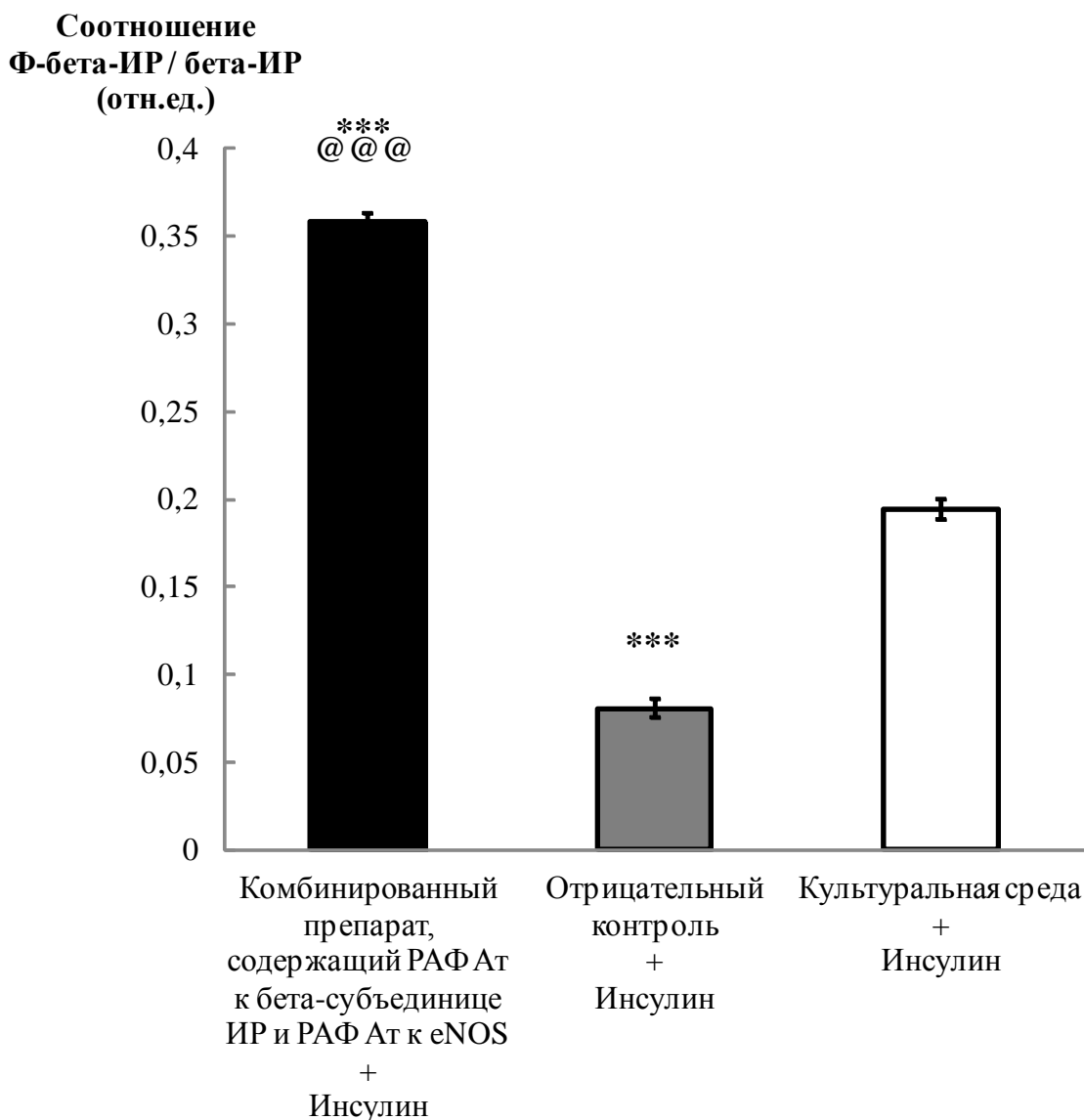


Рисунок 8 – Влияние препарата, содержащего антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, на соотношение фосфорилированных форм бета-субъединиц рецептора инсулина (Ф-бета-ИР) к общим формам бета-субъединиц рецептора инсулина (бета-ИР), экспрессируемых на мембранах зрелых адипоцитов человека в среде, содержащей инсулин (100 нМ). *** – отличия от контроля (культуральная среда) достоверны ($p < 0,001$); @@@ – отличия от отрицательного контроля (очищенная вода) достоверны ($p < 0,001$).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данном исследовании была изучена антидиабетическая активность комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, и отдельных компонентов, входящих в его состав, на экспериментальной модели СД II типа, а также механизм действия комбинированного препарата.

В качестве экспериментальной модели СД II типа были использованы крысы Goto-Kakizaki. Крысы данной линии являются моделью инсулиннезависимого диабета без ожирения, полученной посредством направленного скрещивания нормальных крыс Wistar, с нарушенной толерантностью к глюкозе в качестве критерия отбора (Goto Y. et al., 1988). Крысы Goto-Kakizaki (Парижская колония), которые были использованы в настоящем исследовании, после всасывания глюкозы демонстрируют легкую, но стабильную гипергликемию, с нарушением толерантности к глюкозе после приема пищи (Portha B. et al., 1991; Picarel-Blanchot F. et al., 1996; Portha B., 2005; Portha B. et al., 2009). Хотя их базальный уровень инсулина в плазме крови может быть повышен при отсутствии ожирения, эти крысы не демонстрируют усиления секреции инсулина в ответ на глюкозу *in vivo* (Portha B. et al., 1991). У взрослых крыс запасы инсулина поджелудочной железы снижены на 60%, а общая масса бета-клеток истощена на 50% (Movassat J. et al., 1997). Также у них повышен базальный уровень синтеза глюкозы в печени, а мышечная и жировая ткани демонстрируют резистентность к инсулину (Picarel-Blanchot F. et al., 1996; Movassat J. et al., 2008; Portha B., 2005; Portha B. et al., 2009; Portha B. et al., 2001).

При введении экспериментальным животным РАФ Ат к бета-субъединице ИР курсом продолжительностью 4 недели положительных изменений в показателях содержания HbA1c, инсулина, адипонектина, лептина и глюкагона не отмечалось. Исключение составил уровень GLP-1, для которого наблюдалось статистически значимое возрастание на обоих этапах наблюдений (Д1 и Д28). GLP-1 усиливает ощущение насыщения,

снижает потребление пищи и предотвращает увеличение массы тела, о чем свидетельствуют эксперименты на модели СД II типа у животных и результаты исследования заболевания у людей (Yasuda N. et al., 2004). Однако, несмотря на достоверное повышение GLP-1 в данной группе крыс, РАФ Ат к бета-субъединице ИР не оказали статистически значимого воздействия на потребление корма и воды, а также массу тела у крыс. В тоже время, комбинированный препарат напротив, не оказал влияния на динамику уровня GLP-1, однако в показателях потребления корма отмечалась слабовыраженная (но достоверная ($p < 0,05$)) тенденция к снижению по сравнению с соответствующими показателями в отрицательном контроле (очищенная вода).

В результате введения исследуемым крысам РАФ Ат к бета-субъединице ИР, начиная с 20-х суток (Д20) терапии и вплоть до окончания исследования, у животных наблюдалось снижение в показателях содержания глюкозы в плазме крови по сравнению с исходными показателями ($p < 0,05$). Тем не менее, на 28-е сутки (Д28) исследования уровень глюкозы в плазме крови данных животных хоть и был ниже, чем в группе отрицательного контроля (очищенная вода), но разница не достигала уровня достоверности. При этом, нарушение толерантности глюкозы в данной группе было менее выражено, чем в группе отрицательного контроля (очищенная вода). Данный эффект нельзя объяснить повышением уровня GLP-1, который напрямую способствует улучшению толерантности к глюкозе за счет угнетения выработки глюкозы в печени и усиления активности гликогенсинтазы (Yasuda N. et al., 2004), т.к. комбинированный препарат оказывал статистически значимый положительный эффект на данный параметр, но, как было уже сказано выше, не влиял на уровень пептида. Полученные нами данные отчетливо указывают на то, что по своей эффективности комбинированный препарат превосходит эффект РАФ Ат к бета-субъединице ИР. Важно отметить, что положительные изменения, зарегистрированные в группах комбинированного препарата и РАФ Ат к бета-субъединице ИР, не

отличались от аналогичных изменений в группе животных, которым при тех же экспериментальных условиях вводили росиглитазон. Росиглитазон, как и другие тиазолидинедионы, сокращает содержание глюкозы в крови, сенсibiliзируя ткани-мишени к действию инсулина, в основном за счет ингибирования процесса липолиза в жировой ткани и последующего снижения уровня продукции глюкозы в печени, и повышая опосредованную инсулином утилизацию глюкозы в скелетных мышцах (Srinivasan K. et al., 2004). Данные, полученные при исследовании крыс линии Goto-Kakizaki в группе, получавшей терапию росиглитазоном, согласуются с описываемой точкой зрения, несмотря на то, что прямого изучения метаболических потоков глюкозы мы не проводили. Эти данные также соответствуют ранее полученным результатам на крысах линии Goto-Kakizaki, указывающих на то, что продолжительное введение росиглитазона приводит к повышению толерантности данных животных к глюкозе благодаря сокращению выработки глюкозы клетками печени и обладает умеренным действием на чувствительность периферических тканей к действию инсулина (O'Rourke S.M. et al., 1997).

На фоне введения РАФ Ат к бета-субъединице ИР и комбинированного препарата у исследуемых животных лишь на ранней стадии эксперимента (Д1) наблюдалась тенденция к сокращению уровня лептина (относительно аналогичного уровня в группе отрицательного контроля (очищенная вода)) ($p=0,06$ и $p=0,05$ соответственно), в то время как у крыс, получавших РАФ Ат к eNOS, снижение количества лептина отмечалась на обоих этапах эксперимента, при этом достоверные изменения регистрировались лишь на позднем этапе. Также стоит отметить, что за исключением концентрации лептина, РАФ Ат к eNOS не оказывали влияния на показатели диабетического статуса, измеряемые в плазме крови. Принято считать, что лептин обладает выраженным ингибирующим действием на секрецию инсулина панкреатическими бета-клетками, что было продемонстрировано в *in vitro* и *in vivo* исследованиях, а также обладает добавочным эффектом, в

результате которого наблюдается снижение уровня экспрессии препроинсулинового гена (Dunmore S.J. and Brown J.E., 2013). Тем не менее, изменений в уровне содержания инсулина в плазме крови, а также выработки инсулина в ответ на нагрузку глюкозой на фоне введения РАФ Ат к eNOS, РАФ Ат к бета-субъединице ИР, а также комбинированного препарата выявлено не было.

В настоящем исследовании введение росиглитазона приводило к достоверному снижению концентрации лептина в плазме крови. Такое изменение в регистрируемых уровнях лептина было обусловлено улучшением показателей базальной гипергликемии и толерантности к глюкозе на фоне длительного приема. Кроме того, было обнаружено, что продолжительное введение росиглитазона способствует сокращению объема потребляемой пищи, что не может объясняться снижением уровня лептина в плазме крови. Такая картина выглядит противоречивой, поскольку установлено, что продолжительное введение росиглитазона приводит к повышению содержания лептина в плазме крови вследствие росиглитазон-индуцированного ожирения (Kim H.J. et al., 2008), которое вызвано активацией транскрипционного фактора пероксисом адипоцитов, рецептора PPAR γ , стимулирующего дифференцировку адипоцитов (Chou F.S. et al., 2007). Парадоксальный характер реакции крыс линии Goto-Kakizaki на действие росиглитазона может, по крайней мере, частично отражать нарушение процессов роста/дифференцировки жировой ткани в условиях данной экспериментальной модели, о чем были сделаны более ранние предположения (Berthelie C. et al., 1997; Movassat J. et al., 2008). В данном исследовании в результате продолжительного введения росиглитазона крысам линии Goto-Kakizaki у последних отмечалось достоверное увеличение содержания адипонектина в плазме крови. Наконец, есть основания утверждать, что изменения, регистрируемые в показателях количества циркулирующего в крови лептина и адипонектина у крыс линии

Goto-Kakizaki на фоне введения росиглитазона, могут способствовать снижению гипергликемии и инсулинорезистентности.

Для того, чтобы инсулин смог оказать свое действие на миоциты (стимулировать захват глюкозы клетками), гормон сначала должен преодолеть барьер в виде эндотелиальных клеток. Доставка инсулина в мышечные клетки регулируется скоростью кровотока и его распределением, а также транс-эндотелиальным транспортом. NO запускает множество процессов, которые влияют на доставку инсулина, включая такие как расслабление артериол в мышечной ткани. Было показано, что NO вне зависимости от активности eNOS усиливает захват инсулина клетками эндотелия (Wang H et al., 2013). В то же время инсулин сам по себе является важным активатором eNOS через PI3K-зависимый путь, вызывая увеличение продукции NO в считанные минуты (Kim J.A. et al., 2006; Muniyappa R. et al., 2007). Продукция NO эндотелиальными клетками обладает положительным эффектом на периферическую чувствительность к инсулину (Petrie J.R. et al., 1996).

Ранее было показано, что РАФ Ат к eNOS повышают активность эндогенной eNOS. Препарат, содержащий в качестве активного фармацевтического компонента РАФ Ат к eNOS, продемонстрировал эффективность в качестве монотерапии эректильной дисфункции у людей, а также повышал эффективность ингибиторов фосфодиэстеразы 5-го типа при комбинированной терапии (Chu X. et al., 2013; Chu X. and Agmo A., 2008; Chu X. et al., 2008; Mazo E.V. et al., 2004). Кроме того, было показано, что РАФ Ат к eNOS обладает и эндотелиопротективными свойствами (Epstein O.I., 2009). Однако, ни на одном из этапов настоящего исследования РАФ Ат к eNOS не проявили достоверного влияния на уровень глюкозы в плазме крови, за исключением единичного эпизода повышения концентрации на 12-е сутки (Д12) эксперимента. Это согласуется с данными глюкозотолерантного теста, который свидетельствует, что выраженность нарушения толерантности к глюкозе была даже выше, чем в группе отрицательного контроля (очищенная

вода). Bitar M.S. и соавторы (2005) показали, что у крыс Goto-Kakizaki действие инсулина снижено по сравнению со здоровыми крысами линии Wistar. Данное состояние инсулинорезистентности ассоциировано с нарушением ответа артерий на действие ацетилхолина и нитропрусида натрия, что свидетельствует о дисфункции эндотелия и снижении чувствительности мышечных клеток к действию NO. В основе же диабет-индуцированной эндотелиальной дисфункции лежит снижение биодоступности NO (Bitar M.S. et al., 2005; Wang H. et al., 2013). Причем, это снижение связано не с дефектом в экспрессии фермента, eNOS, которая даже напротив повышена в сосудистой ткани крыс Goto-Kakizaki, а с повышением уровня супероксид аниона (Bitar M.S. et al., 2005; Gupte S. et al., 2010). Как известно, именно супероксид анион разрушает NO и переводит его в пероксинитрит и воду, вызывает разобщение eNOS, нивелируя тем самым её повышенную экспрессию, увеличивает экспрессию индуцибельной NO-синтазы, что все вместе является причиной оксидативного стресса при диабете (Rajesh M. et al., 2007; Rajesh M. et al., 2009 Zou M.H. et al., 2002; Gryglewski R.J. et al., 1986). Оксидативный стресс напрямую вовлечен в развитие инсулинорезистентности (Reaven G.M., 1988). Кроме того, повышенная концентрация лептина у крыс, получавших РАФ Ат к eNOS, также может вносить свой вклад в развитие оксидативного стресса, негативно влияя на продукцию и биодоступность NO (Muniyappa R. et al., 2007). Таким образом, вероятно именно снижение биодоступности NO в комбинации с разобщением eNOS, наблюдаемое у крыс Goto-Kakizaki, не позволяет РАФ Ат к eNOS за счет их влияния на активность eNOS оказать положительный эффект на периферическую чувствительность к инсулину, и, как следствие, контроль гипергликемии. Кроме того очевидно, что только за счет увеличения доставки инсулина к тканям-мишеням, невозможно преодолеть инсулинорезистентность.

Известно, что возобновление инсулин-индуцированного фосфорилирования eNOS через PI3K-зависимый путь в клетках эндотелия

полностью восстанавливает сниженную доставку инсулина к тканям-мишеням до нормальных значений, и, как результат, значительно улучшает захват глюкозы мышечными клетками (Kim J.A., et., 2006; Muniyappa R. et al., 2007; Kubota T. et al., 2013). Как было показано в настоящем исследовании, РАФ Ат к бета-субъединице ИР оказывают достоверное положительное влияние на восстановление чувствительности периферических тканей к инсулину. Концентрация глюкозы в плазме хоть и снижалась, но так и не достигла значимых отличий по сравнению с группой отрицательного контроля (очищенная вода). Однако сочетанное применение РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, то есть применение комбинированного препарата, позволило существенно улучшить чувствительность периферических тканей к инсулину, а также достоверно снизить уровень гипергликемии как по сравнению с исходными значениями, так и со значениями в группе отрицательного контроля (очищенная вода). Можно предположить, что РАФ Ат к бета-субъединице ИР оказывают положительное активирующее влияние на ИР и его сигнальный путь, что само по себе является основой антигипергликемической активности и повышения чувствительности тканей к инсулину. В то же время активация сигнального пути способствует восстановлению сниженной доставки инсулина к тканям-мишеням за счет активности eNOS и продукции NO, которая в свою очередь опосредована действием РАФ Ат к eNOS. Таким образом, действие одного компонента подготавливает и определяет действие второго компонента комбинированного препарата. При этом можно сделать вывод о том, что антигипергликемическая активность комбинированного препарата опосредована, главным образом, действием именно РАФ Ат к бета-субъединице ИР.

Ранее на модели STZ-индуцированного СД была выявлена антидиабетическая активность РАФ Ат к бета-субъединице ИР (Спасов А.А. и соавт., 2007), а также комбинированного препарата, содержащий РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS (Хейфец ИА и соавт., 2012). Было

показано, что как РАФ Ат к бета-субъединице ИР, так и комбинированный препарат обладали выраженным антигипергликемическим действием, а также восстанавливали нарушенную толерантность тканей к глюкозе. Кроме того, комбинированный препарат снижал уровень глюкозы в моче и снижал содержание кетоновых тел в моче. По своей эффективности РАФ Ат к бета-субъединице ИР и комбинированный препарат не уступали препаратам сравнения – инсулину и глибенкламиду, и росиглитазону, соответственно (Спасов А.А. и соавт., 2007; Хейфец ИА и соавт., 2012). Результаты настоящего исследования свидетельствуют, что комбинированный препарат обладает антигипергликемической активностью на модели СД II типа: препарат снижал уровень глюкозы в плазме крови и восстанавливал нарушенную толерантность тканей к глюкозе.

Полученные данные *in vivo* исследования свидетельствуют о том, что активность комбинированного препарата, а также одного из его компонентов, а именно РАФ Ат к бета-субъединице ИР заключается, главным образом, в модулировании воздействия инсулина на ткани-мишени.

Указанный комбинированный препарат относится к новому классу препаратов, для которых был показан новый вид активности (Эпштейн О.И., 2013): в процессе многократного последовательного уменьшения концентрации исходных антител в получаемых разведениях появляется новая активность, отсутствующая у исходной субстанции антител, названная релиз-активностью (РА). Отличительной чертой РАФ антител является их способность не подавлять, а модифицировать активность своей мишени.

Как было показано в ходе изучения специфической активности комбинированного препарата на экспериментальной модели СД II типа, антидиабетическая активность комбинированного препарата превосходит таковую его отдельных компонентов и обусловлена, главным образом, РАФ Ат к бета-субъединице ИР, входящими в состав препарата. Исходя из этого, было сделано предположение, что данный комбинированный препарат преимущественно оказывает влияние на бета-субъединицу ИР,

регулирующую киназную активность данного рецептора (Youngren J.F., 2007).

Известно, что отличительными чертами действия инсулина являются стимулирование и подавление анаболических и катаболических процессов, соответственно. Данные процессы регулируются через сигнальные внутриклеточные пути, и инициируется связыванием инсулина со своим рецептором (García-Vicente S. et al., 2007), в то время как активации внутриклеточных доменов ИР является необходимым условием для инициирования передачи сигналов (Youngren J.F., 2007).

Таким образом, для проверки гипотезы о том, что одним из основных механизмов действия комбинированного препарата является влияние на бета-субъединицу ИР, было проведено изучение его механизма действия на уровне периферических тканей, а именно изучение способности препарата влиять на сигнальный внутриклеточный путь ИР. Исследование проводили в два этапа с использованием зрелых адипоцитов человека.

На первом этапе, оценивали способность комбинированного препарата в отсутствие инсулина влиять на секрецию адипонектина данными клетками. Согласно Shehzad A. (2012), инсулин напрямую стимулирует экспрессию генов адипонектина. Более того, было показано, что обработка инсулином адипоцитов приводит к усилению секреции адипонектина. Точный механизм действия инсулина на биосинтез адипонектина остается неизвестным, но в то же время существует несколько возможных путей, опосредующих его активность. Было сделано предположение, что инсулин, связываясь со своим рецептором, активирует внутриклеточный каскад, который приводит к подавлению активности FoxO1, супрессора рецептора, активируемого PPAR γ , что в свою очередь приводит к индукции биосинтеза адипонектина (Shehzad A. et al., 2012). Важно отметить, что адипонектин способен улучшать метаболизм глюкозы через внутриклеточные пути отличные от сопряженных с инсулином (Stumvoll M. et al., 2005).

Нами было показано, что инкубация зрелых адипоцитов человека в течение 72 часов вместе с комбинированным препаратом привела к достоверному увеличению концентрации адипонектина в культуральной среде. Принимая во внимание вышеизложенное, можно сделать заключение, что комбинированный препарат посредством прямого влияния на бета-субъединицу ИР зрелых адипоцитов человека активирует ИР в отсутствие инсулина в культуральной среде, что в свою очередь вызывает активацию сигнальных путей, ассоциированных с ИР. В результате происходит ингибирование активности FoxO1 и, как следствие, происходит индукция биосинтеза адипонектина.

Стоит отметить, что данные проведенного *in vivo* исследования свидетельствуют о том, что комбинированный препарат вызывает повышение содержания адипонектина в плазме крови, которое, однако, не достигает уровня статистической достоверности ($p=0,07$). В то же время, известно, что у крыс линии Goto-Kakizaki выявлен дисбаланс липолиза и липогенеза, т.е. тех процессов, которые поддерживают системный энергетический метаболизм. Данный дисбаланс обусловлен нарушением в развитии жировой ткани, а именно процесса дифференцировки преадипоцитов в зрелые адипоциты (Xue B. et al., 2011). В основе лежит изменение экспрессии генов, регулирующих процессы адипогенеза и липогенеза. Как результат, у крыс наблюдается нарушение процесса биосинтеза адипонектина и снижение концентрации данного гормона в плазме крови с течением времени (Xue B. et al., 2011).

Вместе с тем, влияние на продукцию адипонектина может являться дополнительным механизмом действия комбинированного препарата. К наиболее существенной роли адипонектина можно отнести инсулин-сенситизирующее воздействие на печень и мышцы как у людей, так и у грызунов. Как отмечается, адипонектин повышает чувствительность тканей к действию инсулина за счет коррекции метаболизма глюкозы и липидов (Luo R. et al., 2012); при этом адипонектин улучшает метаболизм глюкозы

независимо от передачи инсулинового сигнала (Stumvoll M. et al., 2005) и регулирует экспрессию нескольких типов про- и противовоспалительных цитокинов. Основная противовоспалительная функция адипонектина, вероятно, заключается в его способности подавлять синтез TNF α и интерферона гамма и индуцировать выработку противовоспалительных цитокинов, например, антагониста рецептора интерлейкина-10 и интерлейкина-1 (Tilg H. and Moschen A.R., 2006). Также отмечается, что адипонектин оказывает влияние на функциональную активность и жизнеспособность бета-клеток, которые широко известны как ключевые факторы, участвующие в развитии СД II типа и инсулинорезистентности (Dunmore S.J. and Brown J.E., 2013).

На втором этапе, для подтверждения вовлеченности бета-субъединицы ИР в реализацию фармакологического действия комбинированного препарата проводили оценку влияния препарата на экспрессию белка – оценивали соотношение фосфорилированных форм бета-субъединиц ИР к общим (нефосфорилированным формам) бета-субъединиц ИР. Мы показали, что инкубация зрелых адипоцитов человека в течение 72 часов вместе с комбинированным препаратом статистически значимо повышает отношение фосфорилированных форм бета-субъединицы ИР к общему числу бета-субъединиц ИР зрелых адипоцитов человека, а также повышает способность инсулина увеличивать данное соотношение. Последний факт можно объяснить двойным действием на ИР: с одной стороны, инсулин действует на рецептор через альфа-субъединицы, а с другой стороны комбинированный препарат действует через бета-субъединицы рецептора. Это приводит к усилению активации рецептора.

ИР обладает значительным структурным и функциональным сходством с рецепторами ИФР-1: оба рецептора относятся к семейству тирозинкиназных рецепторов и гомология между ними составляет более 50% (Ullrich A. et al., 1986). В то же время известно, что адипоциты человека экспрессируют рецепторы ИФР-1 в значительно меньшей степени, чем ИР

(Bäck K. and Arnqvist H., 2009). Кроме того, хотя ИФР-1 и инсулин связываются и с рецепторами ИФР-1, и с ИР, но аффинность значительно меньше при связывании с противоположным родственным рецептором (Werner H. et al., 2008; Nakaе J. et al., 2001). При этом, в ходе эксперимента мы использовали инсулин в дозе, в которой его тестировали на такой же модели ряд других исследовательских групп (Danielsson A. et al., 2005; Valentino R. et al., 2013; Jager J. et al., 2007), а для проведения Вестерн-блоттинга применяли первичные антитела, которые не связываются с рецепторами ИФР-1. Всё это позволяет нам заключить, что вклад рецепторов ИФР-1 в показанные результаты минимальный и незначительный.

Стоит отметить, что способность прямой активации ИР и активации сигнальных путей, ассоциированных с рецептором, в отсутствие инсулина была показана для множества препаратов (см. главу 2).

Результаты изучения специфической активности комбинированного препарата на экспериментальной модели СД II типа позволили предположить, что антигипергликемический эффект комбинированного препарата опосредован повышением чувствительности тканей к действию инсулина в его присутствии.

Известно, что основные метаболические эффекты инсулина, в том числе его стимулирующее влияние на поглощение глюкозы клетками-мишенями, реализуются при помощи PI3K–Akt/PKB сигнального пути. Под действием PI3K на PIP2 образуется вторичный мессенджер – PIP3, который ответственен за последующую активацию Akt/PKB пути. Таким образом, эффект инсулина на захват глюкозы периферическими тканями через активацию Akt/PKB пути осуществляется при помощи транслокации глюкозного транспортера GLUT-4 из цитозоля в плазматическую мембрану и дальнейшего трансмембранного переноса глюкозы в клетку (Mackenzie R.W. et al., 2014). После приема пищи, в крови повышается уровень глюкозы, вызывая резкое стимулирование секреции инсулина, что в свою очередь приводит к повышению транспорта глюкозы, к ее метаболизму и к запасанию

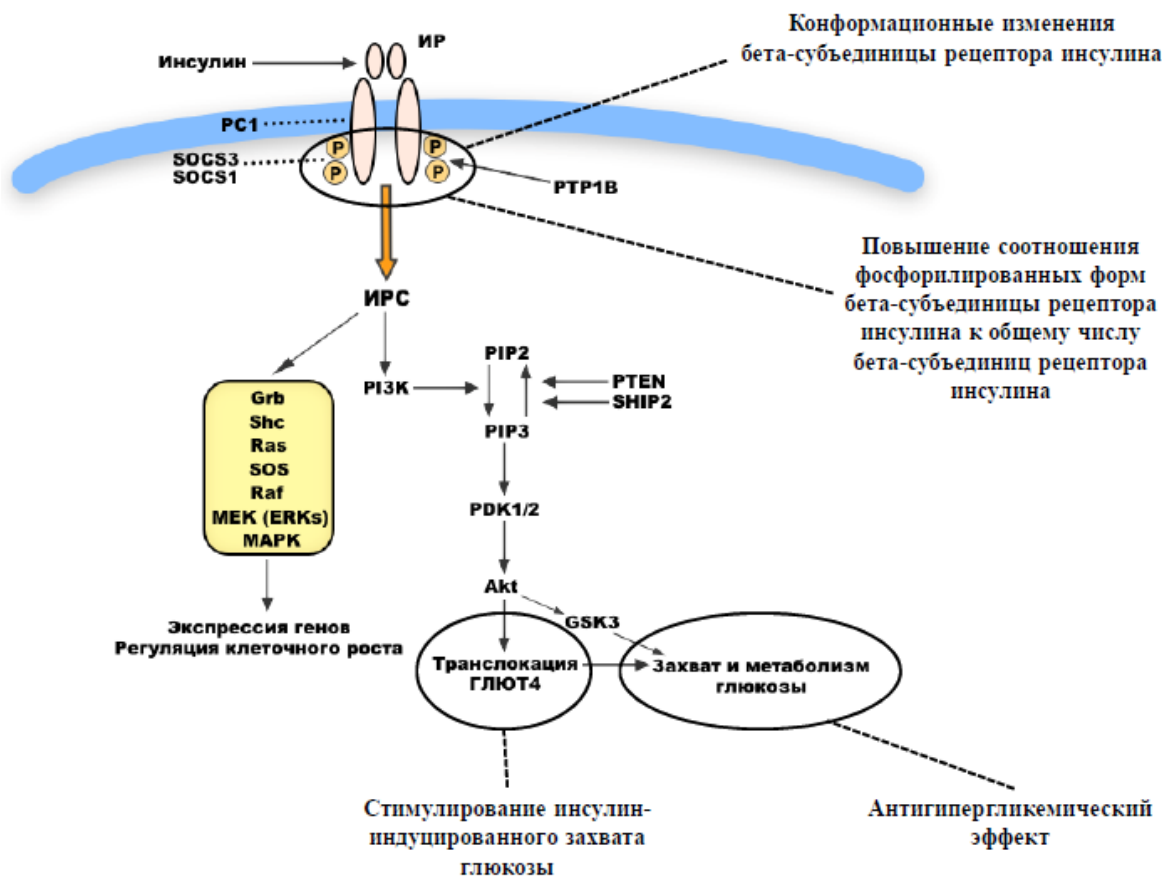
в мышечной и жировой ткани (Shepherd P.R. and Kahn B.B., 2012). В организме мышечная ткань является основной тканью, участвующей в инсулин-индуцированной утилизации глюкозы (Liu Y. et al., 2013). На нее приходится около 80-85% всего захвата глюкозы в периферических тканях, в то время как на жировую ткань – только 4-5% (DeFronzo R.A., 2004). При этом, GLUT-4 является главным инсулинозависимым переносчиком глюкозы в данных тканях (Shepherd P.R. and Kahn B.B., 2012). Инсулин стимулирует перемещение GLUT-4 из внутриклеточного пространства на клеточную поверхность, где транспортер выполняет свою роль в снижении уровня глюкозы в плазме (Bryant N.J. et al., 2002).

Таким образом, логичным этапом в изучении механизма действия комбинированного препарата, а именно исследование его способности повышать чувствительность периферических тканей к действию инсулина, стала оценка влияния препарата на инсулин-индуцированный захват глюкозы мышечными клетками.

Было показано, что комбинированный препарат стимулирует инсулин-индуцированный захват глюкозы клетками скелетной мускулатуры человека. Более того, эффект инсулина в концентрации 10 нМ в присутствии комбинированного препарата достигал значений, полученных для инсулина в концентрации 300нМ. Полученные данные свидетельствуют о том, что комбинированный препарат существенно повышает чувствительность тканей к инсулину, стимулируя перенос глюкозы в миоциты посредством основного ее транспортера GLUT-4.

Исходя из полученных в настоящей работе результатов, касающихся антидиабетических свойств комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, его прямого влияния на ИР и усиления действия инсулина на свой рецептор, а также на основе полученных данных о способности препарата стимулировать инсулин-индуцированный захват глюкозы мышечными клетками человека и повышать продукцию адипонектина в отсутствие инсулина, можно

представить механизм действия препарата следующим образом (схема сигнального пути ИР адаптирована из Lebeche D. et al. (2008)):



Обозначения: ГЛЮТ4, инсулин-зависимый транспортер глюкозы 4; ИР, инсулиновый рецептор; ИРС, субстрат рецептора инсулина; Akt, протеинкиназа В; ERK, киназа, регулируемая внеклеточными сигналами; Grb, белок, связывающий гормон роста; GSK3, киназа 3 гликогенсинтазы; MAPK, митоген-активируемая протеинкиназа; MEK, MAPK/ERK киназа; P, фосфат; PC1, гликопротеин 1 плазматической мембраны; PDK1/2, фосфоинозитол-зависимая протеинкиназа; PI3K, фосфатидилинозитол-3-киназа; PIP2, фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат; PIP3, фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат; PTEN, фосфатаза и гомолог тензина; PTP1B, протеинтирозинфосфатаза 1B; Raf, серин-треониновая протеинкиназа; Ras, малая ГТФаза; Shc, SH2-содержащий белок, связанный с коллагеном; SHIP2, инозитол-5'-фосфатаза 2, содержащая SH2-домен; SOCS1, SOCS 3, супрессоры 1 и 3 сигнальных путей, активируемых

цитокинами; SOS, фактор обмена гуаниновых нуклеотидов для малой ГТФазы Ras.

ВЫВОДЫ

1. На модели сахарного диабета II типа показано, что комбинированный препарат, содержащий антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, обладает антидиабетической активностью, которая проявляется в значимом антигипергликемическом действии, превосходящем таковое росиглитазона.
2. Антидиабетическая активность комбинированного препарата, содержащего антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, превосходит антидиабетическую активность отдельных компонентов и обусловлена, главным образом, антителами к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме, входящими в состав препарата.
3. Комбинированный препарат, содержащий антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, стимулирует инсулин-индуцированный захват глюкозы клетками скелетной мускулатуры человека.
4. Комбинированный препарат, содержащий антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, повышает продукцию адипонектина зрелыми адипоцитами человека, что свидетельствует об активации внутриклеточного сигнального пути рецептора инсулина.
5. Комбинированный препарат, содержащий антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, повышает отношение фосфорилированных форм бета-субъединицы рецептора инсулина к

общему числу бета-субъединиц рецептора инсулина зрелых адипоцитов человека, а также повышает способность инсулина увеличивать данное соотношение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабак, О.Я. Перспективы и безопасность применения агонистов и селективных модуляторов активности PPARs в коррекции метаболических нарушений, связанных с инсулинорезистентностью / О.Я. Бабак, Н.В. Ярмыш, Н.А. Кравченко // Украинский терапевтический журнал. – 2010. – № 3. – С. 7–14.
2. Багирова, Г.Г. Использование артрофоона в лечении заболеваний суставов в амбулаторной практике / Г.Г. Багирова // Актуальные вопросы современной ревматологии. – Материалы областной научно–практической конференции ревматологов. – 2010. – С. 18–28.
3. Ганина, К.К. Релиз-активные антитела к белку S100 способны корректировать течение экспериментального аллергического энцефаломиелита / К.К. Ганина, Ю.Л. Дугина, Е.С. Жавберт, и др. // Журнал неврологии и психиатрии. – 2015. – №6. – С.110–114.
4. Дедов, И.И. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, Г.Р. Галстян, и др. // Сахарный диабет. – 2015. – Т. 18. – № 1. – С. 1–112.
5. Дедов, И.И. Инновационные технологии в лечении и профилактике сахарного диабета и его осложнений / И.И. Дедов // Сахарный диабет. – 2013. – № 3. – С. 2–10.
6. Дедов, И.И. Консенсус совета экспертов Российской ассоциации эндокринологов по инициации и интенсификации сахароснижающей терапии у больных сахарным диабетом 2 типа / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, А.С. Аметов и др. // Сахарный диабет. – 2011. V. – 4. – № 6. – С. 6–17.
7. Доскина, Е.В. Современная комбинированная терапия сахарного диабета 2 типа, или Борьба с «неподдающимся пациентом» / Е.В. Доскина // Эффективная фармакотерапия. – 2014. V. – 1. – № 9. – С. 50–56.

8. Липатов, Д.В. Эпидемиология и регистр диабетической ретинопатии в Российской Федерации / Д.В. Липатов, В.К. Александрова, Д.С. Атарщиков и др. // Сахарный диабет. – 2014. – № 1. – С. 4–7.
9. Матюшин, Г.В. Опыт применения анксиолитического средства в терапии больных с экстрасистолией и пароксизмальными наджелудочковыми тахикардиями / Г.В. Матюшин, В.В. Юрин, С.Е. Головенкин, и др. // Лечащий врач. – 2009. – №2. – С. 76–78.
10. Мкртумян, А.М. Эндоканнабиноидная система как терапевтическая мишень Диетрессы – нового препарата для лечения ожирения. Эффективная фармакотерапия. Эндокринология. – 2011. – № 5. – С. 2–10.
11. Никонова, Т.В. Перспективы антигенспецифической иммунотерапии при сахарном диабете 1 типа / Т.В. Никонова, Ю.В. Алексеева // Сахарный диабет. – 2012. – Т. 15. – № 4. – С. 28–32.
12. Пекарева, Е.В. Роль апоптоза в патогенезе сахарного диабета 1 типа / Е.В. Пекарева, Т.В. Никонова, О.М. Смирнова // Сахарный диабет. – 2010. – Т. 13. – № 1. – С. 45–49.
13. Попонина, Т.М. Лечение хронической / Т.М. Попонина, Е.С. Нолль, Ю.С. Попонина, и соавт. // Бюллетень сибирской медицины. – 2009. – № 4(2). – С. 86–92.
14. Спасов А.А. Исследование антидиабетической активности нового препарата сверхмалых доз антител на модели стрептозотоцинового диабета у крыс / С.А. Сергеева, О.И. Эпштейн // БЭБИМ. – 2007. – V. 144. – № 7. – Р. 50–53.
15. Спасов, А.А. Фундаментальные основы поиска лекарственных средств для терапии сахарного диабета 2-го типа / А.А Спасов, В.И. Петров, Н.И. Чепляева и др. // Вестник Российской Академии Медицинских Наук. – 2013. – № 2. – С. 43–49.
16. Титович, Е.В. Прогнозирование сахарного диабета 1 типа в семьях больных (проспективное 16-летнее наблюдение). Акцент на будущее /

- Е.В. Титович, Т.Л. Кураева, О.Н. Иванова, и др. // Сахарный диабет. – 2014. – Т. 17. – № 3. – С. 83–89.
17. Ткачук, В.А. Молекулярные механизмы развития резистентности к инсулину / В. А. Ткачук, А.В. Воротников // Сахарный диабет. – 2014. – № 2. – С. 29–40.
 18. Ткачук, В.А. Молекулярные механизмы развития резистентности к инсулину / В.А. Ткачук, А.В. Воротников // Сахарный диабет. – 2014. – Т. 17 – № 2. – С.29–40.
 19. Хейфец, И.А. Изучение гипогликемической активности субетты и росиглитазона на модели стрептозотоцинового диабета у крыс / И.А. Хейфец, А.А. Спасов, М.П. Воронкова // БЭБИМ. – 2012. – V. 153. – № 1. – Р. 62–64.
 20. Шиловский, И.П. Новые возможности в терапии респираторно-синцитиальной вирусной инфекции: данные доклинического исследования препарата «Эргоферон» / И.П. Шиловский, Г.В. Корнилова, М.Р. Хаитов // Иммунология. – 2012. – Т. 33. – № 3. – С. 144–148.
 21. Шиловский, И.П. Способность препарата Эргоферон подавлять инфицирующую активность респираторно-синцитиального вируса *in vitro* / И.П. Шиловский, М.С. Прозорова, М.Р. Хаитов // Иммунология. – 2015. – Т. 36. – № 4. – С. 216–219.
 22. Эпштейн О.И. Феномен релиз-активности и гипотеза “пространственного” гомеостаза / О.И. Эпштейн // Успехи физиологических наук. – 2013. – Т. 44. – № 3. – С. 54–76.
 23. Эпштейн, О.И. Влияние различных разведений потенцированных антител к мозгоспецифическому белку S-100 на динамику посттетанической потенциации в переживающих срезах гиппокампа / О.И. Эпштейн, Н.А. Береговой, Н.С. Сорокина, и др. // БЭБИМ. – 1999. – Т. 127. – № 3. – С. 317–320.

24. Эпштейн, О.И. Релиз-активность – от феномена до создания новых лекарственных средств / О.И. Эпштейн // БЭБИМ. – 2012. – V. 154. – № 7. – P. 62–67.
25. Эпштейн, О.И. Сверхмалые дозы (история одного исследования) / О.И. Эпштейн. – М. Изд-во РАМН. –2008. С. –335.
26. Эпштейн, О.И. Фармакология сверхмалых доз антител к эндогенным регуляторам функций / О.И. Эпштейн, М.Б. Штарк, А.М. Дыгай, и соавт. – М. Изд-во РАМН. –2005. С. –226.
27. Яковлева, Н.Н. Анксиолитическое и антидепрессивное действие препаратов «диваза» и «бризантин» / Н.Н. Яковлева, Т.А. Воронина, Н.И. Суслов, и др. // Бюл экспер биол. – 2015. – Т. 159. – № 6. – С. 727–730.
28. Aguirre, V. The c-Jun NH2-terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser307 / V. Aguirre, T. Uchida, L. Yenush, et al. // Journal of Biological Chemistry. – 2000. – V. 275. – № 12. – P. 9047–9054.
29. Alam, U. General aspects of diabetes mellitus / U. Alam, O. Asghar, S. Azmi // Handb Clin Neurol. – 2014. – № 126. – P. 211–222.
30. Altaf, Q.A. Novel therapeutics for type 2 diabetes: insulin resistance / Q.A. Altaf, A.H. Barnett, A.A. Tahrani // Diabetes Obes Metab. – 2015. – V. 17. – № 4. – P. 319–334.
31. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus // Diabetes Care. 2012 Suppl 1:S64-71. doi: 10.2337/dc12-s064.
32. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes // Diabetes Care. – 2014. V. – 37. – № 1. – P. 14–80.
33. Appenzeller-Herzog, C. Bidirectional crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mTOR signaling / C. Appenzeller-Herzog, M.N. Hall // Trends in Cell Biology. – 2012. – V. 22. – № 5. – P. 274–282.

34. Ardon, O. Sequencing analysis of insulin receptor defects and detection of two novel mutations in *INSR* gene / O. Ardon, M. Procter, T. Tvrdik, et al. // *Molecular Genetics and Metabolism Reports*. – 2014. – № 6. – P. 71–84.
35. Atkinson, M.A. The Pathogenesis and Natural History of Type 1 Diabetes / M.A. Atkinson // *Cold Spring Harb Perspect Med*. – 2012. – V. 2. – № 11. – P. 1–19.
36. Bäck, K. Changes in insulin and IGF-I receptor expression during differentiation of human preadipocytes / K. Bäck, H. Arnqvist // *Growth Horm IGF Res*. – 2009. – V. 19. – № 2. – P. 101–111.
37. Bates, S.H. Insulin-like effect of pinitol / S.H. Bates, R.B. Jones, C.J. Bailey // *Br J Pharmacol*. – 2000. – V. 130. – № 8. – P. 1944–1948.
38. Belfiore, A. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease / A. Belfiore, F. Frasca, G. Pandini, et al. // *Endocr Rev*. – 2009. V. – 30. – № 6. – P. 586–623.
39. Bergenstal, R.M. Type 2 diabetes: assessing the relative risks and benefits of glucose-lowering medications / R.M. Bergenstal, C.J. Bailey, D.M. Kendall // *Am J Med*. – 2010. – P. 9–18.
40. Berthelie, C. Lack of deterioration of insulin action with aging in the GK rat: a contrasted adaptation as compared with nondiabetic rats / C. Berthelie, M. Kergoat, B. Portha // *Metabolism*. – 1997. – V. 46. – № 8. – P. 890–896.
41. Bézaire, V. Regulation of adipose tissue lipolysis revisited / V. Bézaire, D. Langin // *Proc. Nutr. Soc*. – 2009. – V. 68. – № 4. – P. 350–360.
42. Bitar, M.S. Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes / M.S. Bitar, S. Wahid, S. Mustafa, et al. // *Eur J Pharmacol*. – 2005. – V. 511. – № 1. – P. 53–64.
43. Bolen, S. Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus / S. Bolen, L. Feldman, J. Vassy, et al. // *Ann Intern Med*. – 2007. – № 6. – P. 386–399.

44. Brunetti, A. Transcriptional regulation of human insulin receptor gene by the high-mobility group protein HMGI(Y) / A. Brunetti, G. Manfioletti, E. Chiefari et al. // *FASEB J.* – 2001. – V. 15. – № 2. – P. 492–500.
45. Bryant, N.J. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4 / N.J. Bryant, R. Govers, D.E. James // *Nature reviews, Molecular cell biology.* – 2002. – V. 3. – № 4. – P. 267–277.
46. Cao, Y. Biological and biomedical functions of Penta-O-galloyl-D-glucose and its derivatives / Y. Cao, K.B. Himmeldirk, Y. Qian, et al. // *J Nat Med.* – 2014. – V. 68. – № 3. – P. 465–472.
47. Castagne, M. Antibodies to S100 proteins have anxiolytic-like activity at ultra-low doses in the adult rat / V. Castagne, M. Lemaire, I. Kheifets, et al. // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2008. – V. 60. – № 3. – P. 309–316.
48. Chames, P. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future / P. Chames, M. Van Regenmortel, E. Weiss, et al. // *Br J Pharmacol.* . – 2009. – V. 157. – № 2. – P. 220–233.
49. Chiu, S.L. Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function / S.L. Chiu, H.T. Cline // *Neural Dev.* – 2010. V. – 5. – № 7. – P. 1–18.
50. Chou, F.S. Effects of thiazolidinediones on differentiation, proliferation, and apoptosis / F.S. Chou, P.S. Wang, S. Kulp, et al. // *Mol Cancer Res.* – 2007. – V. 5. – № 6. – P. 523–530.
51. Chu, X. Effects of chronic treatment with the eNOS stimulator Impaza on penis length and sexual behaviors in rats with a high baseline of sexual activity / X. Chu, E.S. Zhavbert, J.L. Dugina, et al. // *Int J Impot Res.* – 2014. – V. 26. – № 1. – P. 35–40.
52. Chu, X. Sexual incentive motivation in old male rats: the effects of sildenafil and a compound (Impaza) stimulating endothelial NO synthase / X. Chu, A. Agmo // *Pharmacol Biochem Behav.* – 2008. – V. 89. – № 2. – P. 209–217.

53. Chu, X. Sexual incentive motivation in old male rats: the effects of sildenafil and a compound (Impaza) stimulating endothelial NO synthase / X. Chu, A. Agmo // *Pharmacol Biochem Behav.* – 2008. – V. 89. – № 2. – P. 209–217.
54. Chu, X. Sildenafil and a compound stimulating endothelial NO synthase modify sexual incentive motivation and copulatory behavior in male Wistar and Fisher 344 rats / X. Chu, E.S. Zhavbert, J.L. Dugina, et al. // *J Sex Med.* – 2008. – V. 5. – № 9. – P. 2085–2099.
55. Chu, X. Sildenafil and a compound stimulating endothelial NO synthase modifi sexual incentive motivation and copulatory behavior in male Wistar and Fisher 344 rats / X. Chu, E.S. Zhavbert, J.L. Dugina, et al. // *J Sex Med.* – 2008. – V. 5. – № 9. – P. 2085–2099.
56. Colca, J.R. Clinical proof-of-concept study with MSDC-0160, a prototype mTOT-modulating insulin sensitizer / J.R. Colca, J.T. VanderLugt, W.J. Adams, et al. // *Clin Pharmacol Ther.* – 2013. – V. 93. – № 4. – P. 352–359.
57. Colca, J.R. Insulin sensitizers in 2013: new insights for the development of novel therapeutic agents to treat metabolic diseases / J.R. Colca, S.P. Tanis, W.G. McDonald // *Expert Opin Investig Drugs.* – 2014. – V. 23. – № 1. – P. 1–7.
58. Coughlan, K.A. AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes? / K.A. Coughlan, R.J. Valentine, N.B. Ruderman, et al. // *Diabetes Metab Syndr Obes.* – 2014. – № 7. – P. 241–253.
59. Danielsson, A. Insulin resistance in human adipocytes occurs downstream of IRS1 after surgical cell isolation but at the level of phosphorylation of IRS1 in type 2 diabetes / A. Danielsson, A. Ost, E. Lystedt, et al. // *FEBS J.* – 2005. – V. 272. – № 1. – P. 141–151.
60. Davis, J.A. Antihyperglycemic effect of *Annona squamosa* hexane extract in type 2 diabetes animal model: PTP1B inhibition, a possible mechanism of action? / J.A. Davis, S. Sharma, S. Mittra, et al. // *Indian J Pharmacol.* – 2012. – V. 44. – № 3. – P. 326–332.

61. De Meyts, P. Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design / P. De Meyts, J. Whittaker // *Nat Rev Drug Discov.* – 2002. – V. 1. – № 10. – P. 769–783.
62. DeFronzo, R.A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus / R.A. DeFronzo // *The Medical clinics of North America.* – 2004. – V. 88. – № 4. – P. 787–835.
63. DeFronzo, R.A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus / R.A. DeFronzo // *Med Clin North Am.* – 2004. – V. 88. – № 4. – P. 787–835.
64. Donath, M.Y. Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start / M.Y. Donath // *Nat Rev Drug Discov.* – 2014. – № 6. – P. 465–476.
65. Dugina J.L. A randomized, open-label, comparative, 6-month trial of oral ultra-low doses of antibodies to tumor necrosis factor-alpha and diclofenac in rheumatoid arthritis / J.L. Dugina, V.I. Petrov, A.R. Babayeva, et al. // *Int J Tissue React.* – 2005. – V. 27. – № 1. – P. 15–21.
66. Dunmore, S.J. The role of adipokines in β -cell failure of type 2 diabetes / S.J. Dunmore, J.E. Brown // *J Endocrinol.* – 2013. – V. 2016. – № 1. – P. 37–45.
67. Epstein, O.I. Membrane and synaptic effects of anti-S-100 are prevented by the same antibodies in low concentrations. *Front* / O.I. Epstein, N.A. Beregovoy, N.S. Sorokina, et al. // *Front. Biosci.* – 2003. – V. 1. – № 8. – P. 79–84.
68. Fukuda, S. Pharmacological profiles of a novel protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor, JTT-551 / S. Fukuda, T. Ohta, S. Sakata, et al. // *Diabetes Obes Metab.* – 2010. – V. 12. – № 4. – P. 299–306.
69. García-Vicente, S. Oral insulin-mimetic compounds that act independently of insulin / S. García-Vicente, F. Yraola, L. Marti, et al. // *Diabetes.* – 2007. – V. 56. – № 2. – P. 486–493.
70. Geethan, P.K. Antihyperlipidemic effect of D-pinitol on streptozotocin-induced diabetic Wistar rats / P.K. Geethan, P.S. Prince // *J Biochem Mol Toxicol.* – 2008. – V. 22. – № 4. – P. 220–224.

71. Gilardi, F. Crestani M. LT175 is a novel PPAR α/γ ligand with potent insulin-sensitizing effects and reduced adipogenic properties / F. Gilardi, M. Giudici, N. Mitro , et al. // *J Biol Chem.* – 2014. – V. 289. – № 10. – P. 6908–6920.
72. Goto Y., Suzuki K., Sasaki M., Ono T., Abe S. GK rats as a model of nonobese, non-insulin-dependent diabetes: selective breeding over 35 generations. In: Shafrir E, Renold AE, editors. *Frontiers in diabetes research. Lessons from animal diabetes II.* London, UK: John Libbey & Co Ltd, 1988. – P. 301-303.
73. Greenfield, S. Comorbidity affects the relationship between glycemic control and cardiovascular outcomes in diabetes: a cohort study / S. Greenfield, J. Billimek, F. Pellegrini, et al. // *Ann Intern Med.* – 2009. – P. 854–860.
74. Gryglewski, R.J. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium derived vascular relaxing factor / R.J. Gryglewski, R.M. Palmer, S. Monacada // *Nature.* – 1986. – V. 320. – № 6061. – P. 454–456.
75. Gupta, R.K. In vivo evaluation of anti-oxidant and anti-lipidimic potential of *Annona squamosa* aqueous extract in type 2 diabetic models / R.K. Gupta, A.N. Kesari, S. Diwakar, et al. // *J Ethnopharmacol.* – 2008. – V. 118. – № 1. – P. 21–25.
76. Gupte, S. Role of NAD(P)H oxidase in superoxide generation and endothelial dysfunction in Goto-Kakizaki (GK) rats as a model of nonobese NIDDM / S. Gupte, N. Labinskyy, R. Gupte, et al. // *PLoS One.* – 2010. – V. 5. – № 7. – P. e11800.
77. Hardie, D.G. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis / D.G. Hardie, F.A. Ross, S.A. Hawley // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2012. – V. 13. – № 4. – P. 251–262.
78. Hazman, O. Investigation of the Anti-Inflammatory Effects of Safranal on High-Fat Diet and Multiple Low-Dose Streptozotocin Induced Type 2 Diabetes Rat Model / O. Hazman, S. Ovali // *Inflammation.* – 2015. – V. 38. – № 3. – P. 1012–1019.

79. He, R.J. Protein tyrosine phosphatases as potential therapeutic targets / R.J. He, Z.H. Yu, R.Y. Zhang, et al. // *Acta Pharmacol Sin.* – 2014. – V. 35. – № 10. – P. 1227–1246.
80. He, Y. Ursolic acid increases glucose uptake through the PI3K signaling pathway in adipocytes / Y. He, W. Li, Y. Li, et al. // *PLoS One.* – 2014. – V. 9. – № 10. – P. e110711.
81. Hedrington, M.S. Discontinued in 2013: diabetic drugs / M.S. Hedrington, S.N. Davis // *Expert Opin Investig Drugs.* – 2014. – V. 23. – № 12. – P. 1703–1711.
82. Heni, M. Insulin receptor isoforms A and B as well as insulin receptor substrates-1 and -2 are differentially expressed in prostate cancer / M. Heni, J. Hennenlotter, M. Scharpf, et al. // *PLoS One.* – 2012. – V. 7. – № 12. – P. e50953.
83. Hotamisligil, G. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesitylinked insulin resistance / G. Hotamisligil, N. Shargill, B. Spiegelman // *Science.* – 1993. – V. 259. – № 5091. – P. 87–91.
84. Hotamisligil, G.S. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance / G.S. Hotamisligil, P. Arner, J. F. Caro, et al. // *J. Clin. Invest.* – 1995. – V. 95. – № 5. – P. 2409–2415.
85. Hotamisligil, G.S. Inflammation and metabolic disorders / G.S. Hotamisligil // *Nature.* – 2006. – V. 444. – № 7121. – P. 860–867.
86. Hubbard, S.R. The insulin receptor: both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase / S.R. Hubbard // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2013. V. – 5. – № 3. – P. a008946.
87. Ichihara, Y. Rational design and synthesis of 4-substituted 2-pyridin-2-ylamides with inhibitory effects on SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase 2 (SHIP2) / Y. Ichihara, R. Fujimura, H. Tsuneki, et al. // *Eur J Med Chem.* – 2013. – № 62. – P. 649–660.

88. Ichimura, A. Free fatty acid receptors as therapeutic targets for the treatment of diabetes / A. Ichimura, S. Hasegawa, M. Kasubuchi, et al. // *Front Pharmacol.* – 2014. – V. 5. – № 236. – P. 1–6.
89. IDF Diabetes Atlas Seventh Edition 2015. URL: <http://www.diabetesatlas.org/>
90. Inzucchi, S.E. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD) / S. E. Inzucchi, R.M. Bergenstal, J.B. Buse, et al. // *Diabetes Care.* – 2012. V. – 35. – № 6. – P. 1364–1379.
91. Isganaitis, E. Fast Food, Central Nervous System Insulin Resistance, and Obesity / E. Isganaitis, R.H. Lustig // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* – 2005. – V. 25. – № 12. – P. 2451–2462.
92. Ito, M. Pharmacological effects of JTT-551, a novel protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor, in diet-induced obesity mice / M. Ito, S. Fukuda, S. Sakata, et al. // *J Diabetes Res.* – 2014. – № 2014. – P. 680348.
93. Jager, J. Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression / J. Jager, T. Grémeaux, M. Cormont, et al. // *Endocrinology.* – 2007. – V. 148. – № 1. – P. 241–251.
94. Jain, S. Type 2 diabetes mellitus—Its global prevalence and therapeutic strategies / S. Jain, S. Saraf // *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews.* – 2010. V. – 4. – № 1. – P. 48–56.
95. Johnson, T.O. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes / T.O. Johnson, J. Ermolieff, M.R. Jirousek // *Nat Rev Drug Discov.* – 2002. – V. 1. – № 9. – P. 696 –709.
96. Jung, S.H. Insulin-mimetic and insulin-sensitizing activities of a pentacyclic triterpenoid insulin receptor activator / S.H. Jung, Y.J. Ha, E.K. Shim, et al. // *Biochem J.* – 2007. – V. 403. – № 2. – P. 243–250.

97. Kaleem, M. Antidiabetic and antioxidant activity of *Annona squamosa* extract in streptozotocin-induced diabetic rats / M. Kaleem, M. Asif, Q.U. Ahmed, et al. // *Singapore Med J.* – 2006. – V. 47. – № 8. – P. 670–675.
98. Karak, M. Targeting peroxisome proliferator-activated receptor gamma for generation of antidiabetic drug / M. Karak, N.C. Bal, C. Bal, et al. // *Curr Diabetes Rev.* – 2013. – V. 9. – № 4. – P. 275–285.
99. Kim, H.J. Rosiglitazone improves insulin sensitivity with increased serum leptin levels in patients with type 2 diabetes mellitus / H.J. Kim, S.K. Kim, W.S. Shim, et al. // *Diabetes Res Clin Pract.* – 2008. – V. 81. – № 1. – P. 42–49.
100. Kim, J.A. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms / J.A. Kim, M. Montagnani, K.K. Koh, et al. // *Circulation.* – 2006. – V. 113. – № 15. – P. 1888–1904.
101. Koffarnus, R.L. Rivoglitazone: a new thiazolidinedione for the treatment of type 2 diabetes mellitus / R.L. Koffarnus, K.A. Wargo, H.M. Phillippe // *Ann Pharmacother.* – 2013. – V. 47. – № 6. – P. 877–885.
102. Korbecki, J. Biochemical and medical importance of vanadium compounds / J. Korbecki, I. Baranowska-Bosiacka, I. Gutowska, et al. // *Acta Biochim Pol.* – 2012. – V. 59. – № 2. – P. 195–200.
103. Kubota, T. The role of endothelial insulin signaling in the regulation of glucose metabolism / T. Kubota, N. Kubota, T. Kadowak // *Rev Endocr Metab Disord.* – 2013. – V. 14. – № 2. – P. 207–216.
104. Lebeche, D. Interplay between impaired calcium regulation and insulin signaling abnormalities in diabetic cardiomyopathy / D. Lebeche, A. J. Davidoff, R. J. Hajjar // *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* – 2008. V. – 5. – № 11. – P. 715–724.
105. Lemmon, M.A. Cell signaling by receptor tyrosine kinases / M.A. Lemmon, J. Schlessinger // *Cell.* – 2010. V. – 141. – № 7. – P. 1117–1134.

106. Leto, D. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT-4 / D. Leto, A.R. Saltiel // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2012. – V. 13. – № 6. – P. 383–396.
107. Liu, K. Discovery of a potent, highly selective, and orally efficacious small-molecule activator of the insulin receptor / K. Liu, L. Xu, D. Szalkowski // *J Med Chem.* – 2000. – V. 43. – № 19. – P. 3487–3494.
108. Liu, Y. Phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase (PIKfyve) is an AMPK target participating in contraction-stimulated glucose uptake in skeletal muscle / Y. Liu, Y.C. Lai, E.V. Hill et al. // *Biochem J.* – 2013. – V. 455. – № 2. – P. 195–206.
109. Liu, Y. Phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase (PIKfyve) is an AMPK target participating in contraction-stimulated glucose uptake in skeletal muscle / Y. Liu, Y.C. Lai, E.V. Hill, et al. // *The Biochemical journal.* – 2013. – V. 455. – № 2. – P. 195–206.
110. Lum, R.T. Design, synthesis, and structure-activity relationships of novel insulin receptor tyrosine kinase activators / R.T. Lum, M. Cheng, C.P. Cristobal, et al. // *J Med Chem.* – 2008. – V. 51. – № 19. – P. 6173–6187.
111. Luo, R. Serum concentrations of resistin and adiponectin and their relationship to insulin resistance in subjects with impaired glucose tolerance / R. Luo, X. Li, R. Jiang, et al. // *J Int Med Res.* – 2012. – V. 40. – № 2. – P. 621–630.
112. Mackenzie, R.W. Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes / R.W. Mackenzie, B.T. Elliott // *Diabetes Metab Syndr Obes.* – 2014. – № 7. – P. 55–64.
113. Mackenzie, R.W. Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes / R.W. Mackenzie, B.T. Elliott // *Diabetes Metab Syndr Obes.* – 2014. – № 7. – P. 55–64.
114. Maeda, A. Safranil, a novel protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor, activates insulin signaling in C2C12 myotubes and improves glucose

- tolerance in diabetic KK-Ay mice / A. Maeda, K. Kai, M. Ishii, et al. // *Mol Nutr Food Res.* – 2014. – V. 58. – № 6. – P. 1177–1189.
115. Manchem, V.P. A novel small molecule that directly sensitizes the insulin receptor in vitro and in vivo / V.P. Manchem, I.D. Goldfine, R.A. Kohanski, et al. // *Diabetes.* – 2001. – V. 50. – № 4. – P. 824–830.
116. Matthews, D.R. Four decades of uncertainty: landmark trials in glycaemic control and cardiovascular outcome in type 2 diabetes / D.R. Matthews, A. Tsapas // *Diab Vasc Dis Res.* – 2008. V. – 5. – № 3. – P. 216–218.
117. Mazo, E.B. Viagra, cialis, impaza-which of them, to whom, when and how? / E.B. Mazo, S. Gamidov, R.I. Ovchinnikov // *Urologiia.* – 2004. – № 5. – P. 42–48.
118. Ming, Y. CMHX008, a novel peroxisome proliferator-activated receptor γ partial agonist, enhances insulin sensitivity in vitro and in vivo / Y. Ming, X. Hu, Y. Song, et al. // *PLoS One.* – 2014. – V. 9. – № 7. – P. e102102.
119. Movassat, J. Follow-up of Goto-Kakizaki rats during prediabetes highlights increased insulin action and fat deposition despite low insulin secretion / J. Movassat, D. Bailbé, C. Berthelie, et al. // *Am J Physiol.* – 2008. – V. 294. – № 1. – P. 168–175.
120. Movassat, J. Impaired development of pancreatic beta-cell mass is a primary event during the progression to diabetes in the GK rat / J. Movassat, C. Saulnier, B. Portha, et al. // *Diabetologia.* – 1997. – V. 40. – № 8. – P. 916–925.
121. Muniyappa, R. Cardiovascular actions of insulin / R. Muniyappa, M. Montagnani, K.K. Koh, et al. // *Endocr Rev.* – 2007. – V. 28. – № 5. – P. 463–491.
122. Muoio, D.M. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes / D.M. Muoio, C.B. Newgard // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2008. – V. 9. – № 3. – P. 193–205.

123. Nakae, J. Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors / J. Nakae, Y. Kido, D. Accili // *Endocr Rev.* – 2001. – V. 22. – № 6. – P. 818–835.
124. Nguyen, P.H. Insulin-Mimetic Selaginellins from *Selaginella tamariscina* with Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) Inhibitory Activity / P.H. Nguyen, B.T. Zhao, M.Y. Ali, et al. // *J Nat Prod.* – 2015. – V. 78. – № 1. – P. 34–42.
125. Oh da, Y.A Gpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice / Y. Oh da, E. Walenta, T.E. Akiyama, et al. // *Nat Med.* – 2014. – V. 20. – № 8. – P. 942–947.
126. Oppert, J. Plasma glucose, insulin, and glucagon before and after long-term overfeeding in identical twins / J. Oppert, A. Nadeau, A. Tremblay, et al. // *Metabolism.* – 1995. – V. 44. – № 1. – P. 96–105.
127. O'Rourke, C.M. Metabolic effects of troglitazone in the Goto-Kakizaki rat, a non-obese and normolipidemic rodent model of non-insulin-dependent diabetes mellitus / C.M. O'Rourke, J.A. Davis, A.R. Saltiel et al. // *Metabolism.* – 1997. – V. 46. – № 2. – P. 192–198.
128. Paoli, P. The insulin-mimetic effect of Morin: a promising molecule in diabetes treatment / P. Paoli, P. Cirri, A. Caselli // *Biochim Biophys Acta.* – 2013. – V. 1830. – № 4. – P. 3102–3111.
129. Pender, C. Regulation of insulin receptor function by a small molecule insulin receptor activator / C. Pender, I.D. Goldfine, V.P. Manchem, et al. // *J Biol Chem.* – 2002. – V. 277. – № 46. – P. 43565–43571.
130. Petrie, J.R. Endothelial nitric oxide production and insulin sensitivity. A physiological link with implications for pathogenesis of cardiovascular disease / J.R. Petrie, S. Ueda, D.J. Webb, et al. // *Circulation.* – 1996. – V. 93. – № 7. – P. 1331–1333.
131. Picarel-Blanchot, F. Impaired insulin secretion and excessive hepatic glucose production are both early events in the diabetic GK rat / F. Picarel-Blanchot,

- C. Berthelier, D. Bailbé, et al. // *J Physiol.* – 1996. – V. 271. – № 4 Pt 1. – P. 755–762.
132. Pillai, S.I. A novel insulin mimetic vanadium-flavonol complex: synthesis, characterization and in vivo evaluation in STZ-induced rats / S.I. Pillai, S.P. Subramanian, M. Kandaswamy // *Eur J Med Chem.* – 2013. – № 63. – P. 109–117.
133. Ponrasu, T. Efficacy of *Annona squamosa* L in the synthesis of glycosaminoglycans and collagen during wound repair in streptozotocin induced diabetic rats / T. Ponrasu, L. Suguna // *Biomed Res Int.* . – 2014. – № 2014. – P. 124352.
134. Ponrasu, T. Efficacy of *Annona squamosa* on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats / T. Ponrasu, L. Suguna // *Int Wound J.* – 2012. – V. 9. – № 6. – P. 613–623.
135. Portha, B. Beta-cell function and viability in the spontaneously diabetic GK rat. Information from the GK/Par colony / B. Portha, X. Giroix, P. Serradas, et al. // *Diabetes.* – 2001. – V. 50. – № 1. – P. 89–93.
136. Portha, B. Beta-cell insensitivity to glucose in the GK rat, a spontaneous nonobese model for type II diabetes / B. Portha, P. Serradas, D. Bailbé, et al. // *Diabetes.* – 1991. – V. 40. – № 4. – P. 486–491.
137. Portha, B. Programmed disorders of beta-cell development and function as one cause for type 2 diabetes ? The GK rat paradigm / B. Portha // *Diab Metab Res Rev.* – 2005. – V. 21. – № 6. – P. 495–504.
138. Portha, B. The GK Rat Beta-Cell: a Prototype for the Diseased Human Beta-Cell in Type 2 Diabetes? / B. Portha, G. Lacraz, M. Kergoat, et al. // *Mol Cell Endocrinol.* . – 2009. – V. 297. – № 1–2. – P. 73–85.
139. Qiang, G. Identification of a small molecular insulin receptor agonist with potent antidiabetes activity / G. Qiang, S. Xue, J.J. Yang, et al. // *Diabetes.* – 2014. – V. 63. – № 4. – P. 1394–1409.
140. Rajesh, M. Cannabidiol attenuates high glucose-induced endothelial cell inflammatory response and barrier disruption / M. Rajesh, P. Mukhopadhyay,

- S. Batkai, et al. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2007. – V. 293. – № 1. – P. 10–19.
141. Rajesh, M. Xanthine oxidase inhibitor allopurinol attenuates the development of diabetic cardiomyopathy / M. Rajesh, P. Mukhopadhyay, S. Batkai, et al. // *J Cell Mol Med.* – 2009. – V. 13. – № 8. – P. 2330–2341.
142. Ranjana. Insulin secreting and alpha-glucosidase inhibitory activity of hexane extract of *Annona squamosa* Linn. in streptozotocin (STZ) induced diabetic rats / Ranjana, Y.B. Tripathi // *Indian J Exp Biol.* – 2014. – V. 52. – № 6. – P. 623–629.
143. Ranjit, S. Regulation of fat specific protein 27 by isoproterenol and TNF- to control lipolysis in murine adipocytes / S. Ranjit, E. Boutet, P. Gandhi, et al. // *The Journal of Lipid Research.* – 2011. – V. 52. – № 2. – P. 221–236.
144. Rask-Madsen, C. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease / C. Rask-Madsen, C.R. Kahn // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2012. – V. 32. – № 9. – P. 2052–2059.
145. Reaven, G.M. Role of insulin resistance in human disease / G.M. Reaven // *Diabetes.* – 1988. – № 37. – P. 1595–1607.
146. Rehder, D. Vanadium. Its role for humans / D. Rehder // *Met Ions Life Sci.* – 2013. – № 13. – P. 139–169.
147. Saltiel, A.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism / A.R. Saltiel, C.R. Kahn // *Nature.* – 2001. V. – 414. – № 6865. – P. 799–806.
148. Samaranyake, H. Challenges in monoclonal antibody-based therapies / H. Samaranyake, T. Wirth, D. Schenkwein, et al. // *Ann Med.* – 2009. – V. 41. – № 5. – P. 322–331.
149. Samarghandian, S. Safranal treatment improves hyperglycemia, hyperlipidemia and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats / S. Samarghandian, A. Borji, M.B. Delkhosh, et al. // *J Pharm Pharm Sci.* – 2013. – V. 16. – № 2. – P. 352–362.

150. Samuel, V.T. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism / V.T. Samuel, K.F. Petersen, G.I. Shulman // *The Lancet*. – 2010. – V. 375. – № 9733. – P. 2267–2277.
151. Schmitz, K.R. Interaction of antibodies with ErbB receptor extracellular regions / K.R. Schmitz, K.M. Ferguson // *Exp Cell Res*. – 2009. – V. 315. – № 4. – P. 659–670.
152. Selzer, T. Predicting the rate enhancement of protein complex formation from the electrostatic energy of interaction / T. Selzer, G. Schreiber // *J Mol Biol*. – 1999. – V. 287. – № 2. – P. 409–419.
153. Shehzad, A. Adiponectin: regulation of its production and its role in human diseases / A. Shehzad, W. Iqbal, O. Shehzad, et al. // *Hormones (Athens)*. – 2012. – V. 11. – № 1. – P. 8–20.
154. Sheinerman, F.B. Electrostatic aspects of protein–protein interactions / F.B. Sheinerman, R. Norel, B. Honig // *Curr Opin Struct Biol*. – 2010. – № 10. – P. 153–159.
155. Shepherd, P.R. Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus / P.R. Shepherd, B.B. Kahn // *The New England journal of medicine*. – 1999. – V. 341. – № 4. – P. 248–257.
156. Shirwaikar, A. Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Annona squamosa* in streptozotocin-nicotinamide type 2 diabetic rats / A. Shirwaikar, K. Rajendran, C. Dinesh Kumar, et al. // *J Ethnopharmacol*. – 2004. – V. 91. – № 1. – P. 171–175.
157. Siddle, K. Molecular basis of signaling specificity of insulin and IGF receptors: neglected corners and recent advances / K. Siddle // *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2012. V. – 3. – № 34. – P. 1–24.
158. Siddle, K. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players / K. Siddle // *J Mol Endocrinol*. – 2011. V. – 47. – № 1. – P. 1–10.
159. Skyler, J.S. American Diabetes Association; American College of Cardiology Foundation; American Heart Association. Intensive glycemic control and the prevention of cardiovascular events: implications of the ACCORD,

- ADVANCE, and VA diabetes trials: a position statement of the American Diabetes Association and a scientific statement of the American College of Cardiology Foundation and the American Heart Association / J.S. Skyler, R. Bergental, R.O. Bonow, et al. // *Diabetes Care*. – 2009. V. 32. – № 1. – P. 187–192.
160. Snel, M. Ectopic fat and insulin resistance: pathophysiology and effect of diet and lifestyle interventions / M. Snel, J.T. Jonker, J. Schoones, et al. // *International Journal of Endocrinology*. – 2012. – № 2012. – P. 1–18.
161. Spiess, C. Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies / C. Spiess, Q. Zhai, P.J. Carter // *Mol Immunol*. . – 2015. – V. 67. – № 2 Pt A. – P. 95–106.
162. Srinivasan, K. Reversal of glucose intolerance by pioglitazone in high fat diet-fed rats / K. Srinivasan, P.S. Patole, C.L. Kaul et al. // *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. – 2004. – V. 26. – № 5. – P. 327–333.
163. Stumvoll, M. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy / M. Stumvoll, B.J. Goldstein, T.W. van Haeften // *Lancet*. – 2005. – V. 365. – № 9467. – P. 1333–1346.
164. Sundriyal, S. New PPAR γ ligands based on 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone: computer-aided design, synthesis, and receptor-binding studies / S. Sundriyal, B. Viswanad, E. Bharathy, et al. // *Bioorg Med Chem Lett*. – 2008. – V. 18. – № 11. – P. 3192–3195.
165. Tahrani, A.A. Management of type 2 diabetes: new and future developments in treatment / A.A. Tahrani, C.J. Bailey, S. Del Prato, et al. // *Lancet*. – 2011. – V. 378. – № 9786. – P. 182–197.
166. Taniguchi, C.M. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action / C.M. Taniguchi, B. Emanuelli, C.R. Kahn // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2006. V. – 7. – № 2. – P. 85–96.
167. Tarasov S.A. Activity of ultra-low doses of antibodies to gamma-interferon against lethal influenza A, (H1N1) 2009 virus infection in mice / S.A.

- Tarasov, V.V. Zarubaev, E.A. Gorbunov, et al. // *Antiviral Res.* – 2012. – V. 93. – № 2. – P. 219–224.
168. Thareja, S. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors: a molecular level legitimate approach for the management of diabetes mellitus / S. Thareja, S. Aggarwal, T.R. Bhardwaj, et al. // *Med Res Rev.* – 2012. – V. 32. – № 3. – P. 459 –517.
169. Tilg, H. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity / H. Tilg, A.R. Moschen // *Nat Rev Immunol.* – 2006. – V. 6. – № 10. – P. 772–783.
170. Tiwari, N. Therapeutic targets for diabetes mellitus: an update / N. Tiwari, A. K Thakur, V. Kumar, et al. // *Clin Pharmacol Biopharm.* – 2014. V. – 3. – № 1. – P. 1–10.
171. Tsai, H.J. A novel hydroxyfuroic acid compound as an insulin receptor activator. Structure and activity relationship of a prenylindole moiety to insulin receptor activation / H.J. Tsai, S.Y. Chou // *J Biomed Sci.* – 2009. – V. 16. – № 1. – P. 68.
172. Tsapas, A.N of 1 trials in diabetes: making individual therapeutic decisions / A. Tsapas, D.R. Matthews // *Diabetologia.* – 2008. V. – 51. – № 8. – P. 921–925.
173. URL: <http://isispharm.com/backup/Pipeline/Therapeutic-Areas/Metabolic-Disease.htm#ISIS-PTP1BRx>
174. Ullrich, A. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity / A. Ullrich, A. Gray, A. Tam, et al. // *EMBO J.* – 1986. – V. 5. – № 10. – P. 2503–2512.
175. Valentino, R. Bisphenol-A impairs insulin action and up-regulates inflammatory pathways in human subcutaneous adipocytes and 3T3-L1 cells / R. Valentino, V. D'Esposito, F. Passaretti, et al. // *PLoS One.* – 200.3 – V. 8. – № 12. – P. e82099.

176. Verspohl, E.J. Novel pharmacological approaches to the treatment of type 2 diabetes / E.J. Verspohl // *Pharmacol Rev.* – 2012. V. – 64. – № 2. – P. 188–237.
177. Vonderheide, R.H. Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy / R.H. Vonderheide, M.J. Glennie // *Clin Cancer Res.* – 2013. – V. 19. – № 5. – P. 1035–1043.
178. Voronina T.A., Sergeeva S.A., Martyushev-Poklad A.V., Dugina J.L., Epstein O.I. Antibodies to S-100 protein in anxiety-depressive disorders in experimental and clinical conditions. In: Kalueff AV, editor. *Animal Models in Biological Psychiatry*. New York, USA: Nova Science Publishers, 2006. – P. 137-152.
179. Wang, C.F. Overexpression of the insulin receptor isoform A promotes endometrial carcinoma cell growth / C.F. Wang, G. Zhang, L.J. Zhao, et al. // *PLoS One.* – 2013. – V. 8. – № 8. – P. e69001.
180. Wang, H. Nitric oxide directly promotes vascular endothelial insulin transport / H. Wang, A.X. Wang, K. Aylor, et al. // *Diabetes.* – 2013. – V. 62. – № 12. – P. 4030–4042.
181. Wang, L. Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): a review / L. Wang, B. Waltenberger, E.M. Pferschy-Wenzig, et al. // *Biochem Pharmacol.* – 2014. – V. 92. – № 1. – P. 73–89.
182. Ward, C. W. Landmarks in insulin research / C.W. Ward, M.C. Lawrence // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2011. – № 2. – P. 76.
183. Weisberg, S.P. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue / S.P. Weisberg, D. McCann, M. Desai, et al. // *J. Clin. Invest.* – 2003. – V. 112. – № 12. – P. 1796–1808.
184. Werner, H. Similarities and differences between insulin and IGF-I: structures, receptors, and signalling pathways / H. Werner, D. Weinstein, I. Bentov // *Arch Physiol Biochem.* – 2008. – V. 114. – № 1. – P. 17–22.

185. Whitehead, J.P. Signalling through the insulin receptor / J.P. Whitehead, S.F. Clark, B. Urso, et al. // *Curr Opin Cell Biol.* – 2000. V. – 12. – № 2. – P. 222–228.
186. Wullschleger, S. TOR Signaling in Growth and Metabolism / S. Wullschleger, R. Loewith, M.N. Hall // *Cell.* – 2006. – V. 124. – № 3. – P. 471–486.
187. Xie, X. L312, a novel PPAR γ ligand with potent anti-diabetic activity by selective regulation / X. Xie, X. Zhou, W. Chen, et al. // *Biochim Biophys Acta.* – 2015. – V. 1850. – № 1. – P. 62–72.
188. Xue, B. Adipose tissue deficiency and chronic inflammation in diabetic Goto-Kakizaki rats / B. Xue, S. Sukumaran, J. Nie, et al. // *PLoS One.* – 2011. – V. 6. – № 2. – P. e17386.
189. Yamazaki, H. A polybromodiphenyl ether from an Indonesian marine sponge *Lamellodysidea herbacea* and its chemical derivatives inhibit protein tyrosine phosphatase 1B, an important target for diabetes treatment / H. Yamazaki, D.A. Sumilat, S. Kanno, et al. // *J Nat Med.* – 2013. – V. 67. – № 4. – P. 730–735.
190. Yasuda, N. Metformin causes reduction of food intake and body weight gain and improvement of glucose intolerance in combination with dipeptidyl peptidase IV inhibitor in Zucker fa/fa rats / N. Yasuda, T. Inoue, T. Nagakura, et al // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2004. – V. 310. – № 2. – P. 614–619.
191. Youngren, J.F. Regulation of insulin receptor function / J. F. Youngren // *Cell Mol Life Sci.* – 2007. V. – 64. – № 7–8. – P. 873–891.
192. Yudkin, J.S. Intensified glucose control in type 2 diabetes whose agenda? / J.S. Yudkin, B. Richter, E.A. Gale // *Lancet.* V. – 377. – 2011. – № 9773. – P. 1220–1222.
193. Zhang, D. Potential roles of GPR120 and its agonists in the management of diabetes / D. Zhang, P.S. Leung // *Drug Des Devel Ther.* – 2014. – № 8. – P. 1013–1027.

194. Zhang, Y. (+)-Rutamarin as a dual inducer of both GLUT-4 translocation and expression efficiently ameliorates glucose homeostasis in insulin-resistant mice / Y. Zhang, H. Zhang, X.G. Yao, et al. // PLoS One. – 2012. – V. 7. – № 2. – P. e31811.
195. Zorzano, A. Arylalkylamine vanadium salts as new anti-diabetic compounds / A. Zorzano, M. Palacín, L. Marti, et al. // J Inorg Biochem. – 2009. – V. 103. – № 4. – P. 559–566.
196. Zou, M.H. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite / M.H. Zou, C. Shi, R.A. Cohen // J Clin Invest. – 2002. – V. 109. – № 6. – P. 817–826.