

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский
институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения
Российской академии наук

На правах рукописи

Понькина Дарья Андреевна

**ПРОТИВОДИАБЕТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ
БЕНЗИЛОКСИФЕНИЛПРОПАНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
ИЗОБОРНИЛАМИНА И БОРНЕОЛА
(экспериментальное исследование)**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Хвостов Михаил Владимирович

Новосибирск – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Этиология и диагностика сахарного диабета 2 типа	15
1.2 Патогенез сахарного диабета 2 типа	17
1.2.1 Инсулинорезистентность	17
1.2.2 Дисфункция β -клеток поджелудочной железы.....	22
1.3 Осложнения сахарного диабета 2 типа	23
1.3.1 Макрососудистые осложнения	24
1.3.2 Микрососудистые осложнения	26
1.3.3 Неклассифицируемые осложнения	27
1.4 Лечение сахарного диабета 2 типа	30
1.4.1 Препараты сульфонилмочевины и глиниды.....	32
1.4.2 Инкретиномиметики	33
1.4.3 Бигуаниды.....	35
1.4.4 Тиазолидиндионы.....	38
1.4.5 Ингибиторы α -глюкозидазы	39
1.4.6 Ингибиторы натрий-глюкозного котранспортера-2	40
1.5 Новые молекулярные мишени для лечения сахарного диабета 2 типа	41
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	46
2.1 Экспериментальные животные.....	46
2.2 Исследуемые соединения	46
2.3 Фармакологические модели и тесты	49
2.3.1 Оральный глюкозотолерантный тест	49
2.3.2 Скрининг гипогликемической активности	50
2.3.3 Генетически обусловленная модель сахарного диабета 2 типа.....	50
2.3.4 Диет-индуцированная модель сахарного диабета 2 типа.....	51
2.3.5 Тетрахлорметан – индуцированная модель гепатотоксичности.....	52
2.3.6 Биохимическое исследование крови	53

2.3.7 Гистологическое исследование печени.....	53
2.3.8 Морфометрическое исследование печени	54
2.3.9 Определение концентрации инсулина в крови мышей методом ИФА	54
2.3.10 Определение концентрации GIP в крови мышей методом ИФА.....	55
2.4 Исследования <i>in vitro</i>	56
2.4.1 Определение активности соединений по отношению к FFAR1	56
2.4.2 Изучение способности соединений ингибировать фермент DPP-4.....	56
2.4.3 Изучение соединений на клеточной культуре HepG2	57
2.5 Определение острой токсичности	58
2.6 Статистическая обработка данных.....	58
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	60
3.1 Скрининг структурных аналогов соединения QS-528	60
3.2 Изучение дозозависимого гипогликемического действия соединений QS-528 и QS-619.....	61
3.3 Изучение гипогликемического действия соединений QS-528 и QS-619 на генетически обусловленной модели СД2	64
3.3.1 ОГТТ на мышах линии C57Bl/6J A ^y / _a	65
3.3.2 Биохимическое исследование крови	67
3.3.3 Гистологическое исследование печени.....	68
3.3.4 Морфометрическое исследование печени	72
3.4 Изучение гипогликемического действия соединений QS-528 и QS-619 на диет-индуцированной модели СД2.....	74
3.4.1 ОГТТ на мышах линии C57Bl/6J A ^y / _a	74
3.4.2 Биохимическое исследование крови	77
3.4.3 Гистологическое исследование печени.....	79
3.5 Изучение механизма действия соединений QS-528 и QS-619.....	83
3.5.1 Определение способности соединения QS-619 активировать FFAR1.....	83
3.5.2 Определение способности соединений QS-528 и QS-619 ингибировать фермент DPP-4	83
3.5.3 Определение концентрации инсулина и GIP	84

3.6 Исследование острой токсичности.....	87
3.7 Изучение гепатопротекторного действия соединения QS-528 на тетрахлорметан – индуцированной модели гепатотоксичности	88
3.7.1 Биохимическое исследование крови	89
3.7.2 Гистологическое исследование печени.....	90
3.7.3 Морфометрическое исследование печени	96
3.8 Изучение соединений QS-528 и QS-619 на клетках линии HepG2.....	100
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	104
ВЫВОДЫ	109
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	110
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	113

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Темпы роста сахарного диабета 2 типа (СД2) в популяции неуклонно возрастают, создавая серьезную медико-социальную проблему для здоровья человека. Известно, что на СД2 приходится 90% всех случаев диабета, составляя 483 млн человек среди взрослых в возрасте от 20 до 79 лет (IDF, 2021).

СД2 — это хроническое неинфекционное мультисистемное заболевание, характеризующееся, главным образом, нарушением углеводного обмена, а именно неэффективным использованием инсулина организмом для утилизации глюкозы (инсулинорезистентность) (Faselis C. et al., 2019; Viigimaa M. et al., 2019). В результате возникает гипергликемия, длительное воздействие которой приводит к развитию микроваскулярных (ретинопатии, нефропатии, нейропатии) и макроваскулярных (кардио и цереброваскулярные заболевания, поражение сосудов нижних конечностей) осложнений (Roglic G., 2016; Viigimaa M. et al., 2019). При этом, сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), являющиеся основным макрососудистым осложнением СД2, занимают лидирующую позицию среди причин смерти взрослого населения (Viigimaa M. et al., 2019). Следовательно, для предупреждения развития осложнений СД2 и снижения риска смерти от ССЗ необходимо поддерживать нормальный уровень гликемии в крови.

С этой целью применяют несколько классов пероральных противодиабетических препаратов, а именно препараты с инсулин-зависимым и инсулин-независимым механизмом действия. Несмотря на широту применения каждый из них имеет свои побочные эффекты. Так, например, препарат выбора — метформин имеет риск развития желудочно-кишечных расстройств (тошнота, метеоризм, диарея) и лактоацидоза, а препараты сульфонилмочевины и глиниды — гипогликемии. Неблагоприятными клиническими проявлениями тиазолидиндионов являются увеличение веса, периферические отеки и остеопороз. Аналоги глюкагонподобного пептида-1 (GLP-1), ингибиторы дипептидил-пептидазы-4 (DPP-4) и ингибиторы α -глюкозидазы вызывают желудочно-

кишечный дискомфорт. Риск развития урогенитальных инфекций и гиперлипидемии имеется у ингибиторов натрий-глюкозных ко-транспортеров (SGLT) 2 (Marin-Penalver J.J. et al., 2016). Таким образом, распространенность заболеваемости СД2 и недостатки имеющейся сахароснижающей терапии обуславливают необходимость улучшения лекарственной терапии СД2, в частности, за счет поиска новых гипогликемических средств, в том числе, влияющих на новые молекулярные мишени.

Одной из таких перспективных мишеней является рецептор свободных жирных кислот-1 (FFAR1), высоко экспрессируемый на β -клетках поджелудочной железы (ПЖ) и энтероэндокринных – К и L клетках кишечника (Edfalk S. et al., 2008). Связывание агониста FFAR1 с соответствующим рецептором на β -клетках ПЖ активирует $G\alpha_q$ – субъединицу гетеротримерного комплекса и запускает внутриклеточный каскад реакций, приводящий к прямой стимуляции секреции инсулина (Burant C.F., 2013). Помимо этого, за счет активации не только $G\alpha_q$, но и $G\alpha_s$ – субъединиц происходит стимуляция секреции глюкозозависимого инсулиотропного полипептида (GIP) и GLP-1 К и L клетками кишечника, соответственно, которые, в свою очередь, вносят дополнительный вклад в секрецию инсулина β -клетками (Nause M. et al., 2015). При этом важно отметить, что агонисты FFAR1 стимулируют секрецию инсулина только при высокой концентрации глюкозы в крови, что предотвращает развитие гипогликемии (Oh D.Y., Olefsky J.M., 2016). Таким образом, поиск новых противодиабетических соединений, являющихся агонистами FFAR1, является весьма актуальным направлением как для современной фармакологии, так и для терапии СД2.

Степень разработанности проблемы. За последние несколько лет было открыто множество агонистов FFAR1, но ни один из них не достиг фармацевтического рынка (Hara T., 2017). Наиболее изученными агонистами FFAR1 являются TAK-875 (Fasiglifam) (достиг 3 стадии клинических испытаний (КИ)), LY2881835 (достиг 1 стадии КИ), AMG 837 (достиг 1 стадии КИ) (рисунок 3). Однако их дальнейшее исследование было прекращено в связи с гепатотоксичностью (Li X.H. et al., 2020). Несмотря на это разработка новых

агонистов FFAR1 продолжается. Среди них сообщалось о соединении – CPL207280, которое в отличие от TAK-875 не оказывало никакого вредного воздействия на печень здоровых и больных СД2 мышей. Следовательно, существует возможность создать эффективный и безопасный агонист FFAR1 (Bazydlo-Guzenda K. et al., 2021).

Не так давно было обнаружено, что FFAR1 экспрессируется не только на β -клетках ПЖ и энтероэндокринных клетках кишечника, а также на клетках печени. Матричная РНК FFAR1 была обнаружена в гепатоцитах и в клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2), хотя доказательства экспрессии эндогенного печеночного белка отсутствуют (Kurtz R. et al., 2021). Точную роль FFAR1 в регуляции функции печени еще предстоит выяснить (Kimura T. et al., 2020). Однако, недавние исследования показали, что активация FFAR1 выполняет защитную функцию в печени: снижает уровень свободных жирных кислот и триглицеридов (ТГ) в печени, уменьшает окислительный стресс, фиброз и воспаление (Kimura T. et al., 2020; Kurtz R. et al., 2021). Подобное действие было обнаружено у полного агониста FFAR1 – SCO-267. При пероральном введении (*per os*) этого соединения мышам с неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП) было отмечено уменьшение массы печени, выработки ТГ и коллагена, снижение уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ) в крови, при отсутствии влияния на потребление животными пищи или изменения уровня глюкозы (Ookawara M. et al., 2020). Исследование другого агониста FFAR1 – PBI-4050 показало значительный антифибротический эффект у мышей с фиброзом печени, индуцированным тетрахлорметаном (CCl₄) (Gagnon L. Et al., 2018). Помимо этого, было обнаружено, что докозагексаеновая кислота (DHA) – эндогенный агонист FFAR1 и других рецепторов, связанных с G белком, опосредует свое антилипогенное действие через FFAR1 в гепатоцитах (On S. et al., 2019). Выявлена повышенная экспрессия этих рецепторов в гепатоцитах мыши под влиянием DHA и показана их ключевая роль в ингибировании накопления липидов в клетках через снижение экспрессии липогенных ферментов. Таким образом, агонисты FFAR1 проявляют гепатопротекторный эффект за счет непосредственного действия на гепатоциты,

либо опосредованно через глюкозозависимый инсулиотропный путь. Учитывая выше сказанное, можно предположить, что FFAR1 является перспективной терапевтической мишенью не только для поиска новых гипогликемических, но и гепатопротекторных соединений.

Ранее сотрудниками Лаборатории физиологически активных веществ НИОХ СО РАН было синтезировано соединение – хлорид (1R,2R,4R)-N-(4-((4-(2-карбоксиэтил) фенокси) метил) бензил)-1,7,7-триметилбицикло [2.2.1] гептан-2-аммония под шифром QS-528 (рисунок 4), совмещающее в своей структуре фрагмент фенилпропановой кислоты (ФПК) с N-экзоборнильным фрагментом, полученным из камфоры, которое проявляло гипогликемический эффект в тестах *in vivo* на мышах. Также было обнаружено, что оно является агонистом FFAR1 (Kurpanov S.O. et al., 2020). В данной работе мы исследовали противодиабетическое действие новых структурных аналогов соединения QS-528, являющихся потенциальными агонистами FFAR1, в которых варьировался терпеновый фрагмент, линкер, связывающий фрагмент фенилпропановой кислоты с терпеновым остовом, а также гетероатом (N или O), посредством которого терпеновый остов был связан с линкером (таблица 1).

Цель исследования: изучить противодиабетические свойства хлорида (1R,2R,4R)-N-(4-((4-(2-карбоксиэтил) фенокси) метил) бензил)-1,7,7-триметилбицикло [2.2.1] гептан-2-аммония (QS-528) и его структурных аналогов в эксперименте *in vivo* и *in vitro*.

Задачи исследования:

1. Провести скрининг новых структурных аналогов хлорида (1R,2R,4R)-N-(4-((4-(2-карбоксиэтил) фенокси) метил) бензил)-1,7,7-триметилбицикло [2.2.1] гептан-2-аммония (QS-528) на наличие гипогликемической активности в глюкозотолерантном тесте на мышах и выбрать соединение-лидер;
2. Провести изучение противодиабетического действия QS-528 и соединения-лидера на генетически обусловленной и диет-индуцированной модели сахарного диабета 2 типа;

3. В исследованиях *in vitro* и *in vivo* изучить предполагаемый механизм действия соединения QS-528 и соединения-лидера;

4. Изучить гепатопротекторное действие соединения QS-528 на CCl₄ – индуцированной модели гепатотоксичности;

5. Изучить влияние QS-528 и соединения-лидера на потребление глюкозы клетками линии HepG2.

Научная новизна. В данной работе впервые проведено исследование противодиабетического действия соединения QS-528 и его структурных аналогов. Впервые по результатам глюкозотолерантного теста было показано, что соединение (3-(4-(4-(((1S,2R,4S)-1,7,7-триметилбицикло [2.2.1] гептан-2-илокси) метил) бензилокси) фенил) пропановая кислота) под шифром QS-619 проявляет гипогликемическое действие на генетической и диет-индуцированной моделях сахарного диабета 2 типа. Соединение QS-528 на данных моделях СД2 не проявило искомую активность, однако впервые было обнаружено его гепатопротекторное действие на основании данных биохимического и гистологического исследования. Также впервые было проведено исследование соединения QS-528 на CCl₄ – индуцированной модели гепатотоксичности, которое подтвердило гепатопротекторное действие QS-528 при метаболическом повреждении печени.

При изучении механизма действия соединения QS-619 впервые было установлено, что оно, аналогично своему структурному аналогу, является агонистом FFAR1. Причем как соединение QS-619, так и QS-528, вероятно, являются полными агонистами этого рецептора, т.к. нами впервые было обнаружено, что оба соединения стимулируют секрецию инсулина и GIP. Впервые было показано, что QS-619 и QS-528 не ингибируют фермент DPP-4, следовательно повышение секреции GIP, скорее всего, связано именно с активацией FFAR1.

По результатам исследования острой токсичности соединений QS-528 и QS-619 впервые было установлено, что они являются нетоксичными соединениями в дозе 1000 мг/кг, поскольку по окончании эксперимента мы не наблюдали летальность, изменение внешнего вида и поведения животных. Исходя из этого,

можно предположить, что их среднесмертельная доза (LD_{50}) значительно выше этой дозы.

На основании полученных данных при исследовании соединений QS-528 и QS-619 на клетках линии HepG2 впервые было показано, что QS-619 повышает потребление глюкозы и высвобождение лактата, тогда как QS-528 увеличивает выживаемость клеток. Эти данные подтверждают гипогликемическое действие QS-619 и гепатопротекторное действие QS-528.

Теоретическая и практическая значимость работы. Одной из важных задач фармакологии является разработка лекарственных средств, обладающих противодиабетическим действием с целью улучшения качества жизни пациентов, облегчения течения микро- и макрососудистых осложнений. Данные, полученные в ходе исследований соединения QS-528 и его структурных аналогов, позволяют дополнить фундаментальные знания о фармакологических свойствах агонистов FFAR1 для дальнейшей разработки новых лекарственных препаратов этого класса. Особенно важно обнаружение гепатопротекторного действия у соединения QS-528, поскольку в литературе, в основном, сообщают о наличии гепатотоксического действия среди агонистов FFAR1, в связи с чем многие из них были сняты с клинических испытаний. Кроме того, в литературе имеется очень мало данных о наличии гепатопротекторного эффекта у подобных соединений. Таким образом, на основании полученных нами результатов, возможна разработка новых агонистов FFAR1, обладающих мультифункциональным действием, что позволит пациентам с СД2 поддерживать гликемический профиль на должном уровне, улучшить течение метаболических нарушений, в частности НАЖБП.

Поскольку в настоящее время нет агонистов FFAR1, применяемых в клинической практике, наши соединения – QS-528 и QS-619 можно рассматривать как перспективные кандидаты для дальнейшего изучения их фармакологического действия с последующим выходом на стадию клинических испытаний.

Материалы данной работы могут быть использованы при подготовке лекционных спецкурсов по фармакологии, медицинской и фармацевтической химии.

Методология и методы исследования. Было проведено комплексное исследование, сочетающее экспериментальные исследования *in vivo* с целью изучения противодиабетического действия соединения QS-528 и его структурных аналогов на моделях патологии и исследования *in vitro* для изучения предполагаемого механизма действия соединений. Все исследования были проведены на базе Лаборатории фармакологических исследований ФГБУН Новосибирского института органической химии им Н.Н. Ворожцова СО РАН.

Исследования *in vivo* были выполнены в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств (Миронов А.Н., 2012), а также международными протоколами исследований. Объектами исследования были выбраны аутбредные самцы мышей CDI, самцы мышей линии C57Bl/6J и C57Bl/6J A^y/_a. Изучение противодиабетического действия проводили на генетически обусловленной (Derkach K.V. et al., 2017; Klebig M.L. et al., 1995) и диет-индуцированной модели СД2 (Petro A.E. et al., 2004; Surwit R.S. et al., 1988). Для исследования гепатопротекторного действия использовали модифицированную модель CCl₄ – индуцированной гепатотоксичности (Kojima-Yuasa A. et al., 2016). Определение концентрации GIP и инсулина проводили в соответствии с руководством стандартного набора ИФА.

Изучение механизма действия соединения-лидера *in vitro*, а именно его способность активировать FFAR1, проводили с использованием стандартного набора ИФА в соответствии с руководством производителя. Влияние QS-528 и его наиболее активного структурного аналога на способность клеток линии HepG2 потреблять глюкозу и высвобождать лактат, а также оценку жизнеспособности клеток этой линии под воздействием исследуемых соединений проводили с учетом международных протоколов исследований.

Положения, выносимые на защиту:

1. Соединение – (3-(4-(4-(((1S,2R,4S)-1,7,7-триметилбицикло [2.2.1] гептан-2-илокси) метил) бензилокси) фенил) пропановая кислота) под шифром QS-619 проявляет противодиабетическое действие на генетически обусловленной и диет-индуцированной модели СД2.

2. Соединение – хлорид (1R,2R,4R)-N-(4-((4-(2-карбоксиэтил) феноксид) метил) бензил)-1,7,7-триметилбицикло [2.2.1] гептан-2-аммония под шифром QS-528 обладает гепатопротекторным эффектом на генетически обусловленной и диет-индуцированной модели СД2, и на модели CCl_4 – индуцированной гепатотоксичности.

3. Соединения QS-528 и QS-619 являются агонистами FFAR1 и стимулируют секрецию инсулина и GIP.

4. Соединение QS-528 проявляет гепатопротекторное действие на модели CCl_4 – индуцированной гепатотоксичности.

5. Соединение QS-528 увеличивает выживаемость клеток линии HepG2, тогда как QS-619 повышает потребление ими глюкозы и высвобождение лактата, не влияя на жизнеспособность клеток.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных данных обеспечивалась применением верифицированных методов исследования, соответствующих поставленным задачам, современных экспериментальных моделей, достаточного количества лабораторных животных и методов исследования *in vitro*. Сформулированные выводы основаны на полученных в ходе исследования данных, их статистической обработке и анализе литературных источников по теме диссертации.

Основные материалы диссертации были представлены на международной научно-практической конференции «MDPI 6th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry» (Базель, Швейцария, 2020г.), 58-й международной научной студенческой конференции «МНСК-2020» (Новосибирск, Россия, 2020), IV Российской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Сахарный диабет-2021: от мониторинга к управлению» (Новосибирск, Россия, 2021), первой всероссийской школе по медицинской химии для молодых ученых «MedChemSchool-2021» (Новосибирск, Россия, 2021), 5-й Российской конференции по медицинской химии с международным участием «MedChem-Russia 2021» (Волгоград, Россия, 2021), международной научно-практической конференции «MDPI 7th International Electronic Conference on

Medicinal Chemistry» (Базель, Швейцария, 2021г.), международной научно-практической конференции «MDPI 8th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry» (Базель, Швейцария, 2022г.), XII Всероссийской научной конференции с международным участием и школой молодых ученых «Химия и технология растительных веществ» (Киров, Россия, 2022), VIII Междисциплинарной конференция «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (Санкт-Петербург, Россия, 2023), Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные проблемы органической химии» (Новосибирск, Россия, 2023). Работа была поддержана грантом Российского научного фонда 21-73-00246.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 работ, из них 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, индексируемых в международных реферативных базах данных и системах цитирования Web of Science и Scopus, 10 тезисов в материалах российских и международных научных конференций.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Диссертационное исследование выполнялось в рамках государственного задания Федерального государственного бюджетного учреждения науки Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук (ФГБУН НИОХ СО РАН) «Современные подходы к изучению токсико-фармакологических свойств биологически активных веществ, лекарственных форм и материалов для медицины» (рук. проф. Т.Г. Толстикова), (приоритетное направление 1.4.5.4. Химико-биологический скрининг новых лекарственных средств), а также при поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) № 21-73-00246 по теме: «Синтез фенилпропановых кислот, содержащих фрагменты терпеноидов, в качестве потенциальных агонистов FFAR1 и изучение их противодиабетической активности».

Личное участие автора. Непосредственно соискатель проводил литературный поиск по информационным базам данных, принимал участие в

разработке программы проведения фармакологических исследований, направленных на изучения противодиабетической активности исследуемых соединений. Автор самостоятельно проводил экспериментальные исследования *in vivo*, выполнял статистическую обработку данных, анализировал и интерпретировал полученные результаты, а также принимал участие в гистологическом исследовании срезов печени и исследованиях *in vitro*.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 132 страницах машинописного текста и состоит из введения, трех глав (обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения), заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа иллюстрирована 41 рисунком и 11 таблицами. Библиографические ссылки включают 169 источников, из которых 161 - публикации зарубежных авторов.

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю д.б.н. М.В. Хвостову за ценные указания в интерпретации полученных результатов и советы при написании диссертационной работы. Автор благодарит сотрудников Лаборатории физиологически активных веществ НИОХ СО РАН (зав. лаб. – член-корр. РАН, д.х.н. Н.Ф. Салахутдинов) за предоставление соединений для фармакологического исследования, сотрудников Лаборатории фармакологических исследований НИОХ СО РАН (зав. лаб. – д.б.н., проф. Т.Г. Толстикова) за помощь при проведении экспериментов, и лично д.м.н. Н.А. Жукову за помощь в проведении гистоморфологических исследований, к.б.н. М.К. Маренину за помощь в проведении исследований *in vitro*, Ю.В. Мешкову за помощь в проведении биохимического исследования крови.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Этиология и диагностика сахарного диабета 2 типа

По данным Международной диабетической федерации на 2021 год 537 миллионов человек в возрасте от 20 до 79 лет страдают сахарным диабетом и предполагается, что это число возрастет до 643 миллионов к 2030 году (Sun H. et al., 2022). При этом среди общего количества людей, страдающих диабетом, на долю сахарного диабета 1 типа и гестационного сахарного диабета приходится только 10%, тогда как СД2 составляет 90%, что делает его гораздо более важной проблемой для системы здравоохранения всех стран мира (Reed J. et al., 2021). СД2 – это одно из наиболее распространенных метаболических заболеваний во всем мире, характеризующееся хронической гипергликемией, развивающейся вследствие двух основных факторов: снижения чувствительности периферических тканей к инсулину (инсулинорезистентность) и относительной недостаточности секреции инсулина β -клетками ПЖ (Galicia-Garcia U. et al., 2020; Анциферов М.Б., 2021). Существуют заметные географические различия в распространенности СД2: самая низкая частота заболевания наблюдается в сельских районах развивающихся стран, промежуточная в развитых странах и самая высокая в определенных этнических группах, особенно в тех, которые стали следовать западному образу жизни, включающему высококалорийную диету и малоподвижный образ жизни (Khan M.A.B. et al., 2020; Forouhi N.G., Wareham N.J., 2022). Также отмечается небольшая половая разница среди людей, страдающих СД2: по данным 2021 года у мужчин развивался СД2 гораздо чаще, чем у женщин (Forouhi N.G., Wareham N.J., 2022).

Для постановки диагноза СД2 применяются следующие диагностические критерии: повышение концентрации глюкозы плазмы крови $\geq 7,0$ ммоль/л натощак и $\geq 11,1$ ммоль/л через 2 часа после пероральной нагрузки глюкозой (75 г.), или $\geq 11,1$ ммоль/л при случайном измерении глюкозы в случае наличия симптомов диабета; а также повышение гликированного гемоглобина (HbA1c) $\geq 6,5\%$ (Blonde L. et al., 2022; WHO, 2019). Следовательно, с одной стороны постановка диагноза

проста, но с другой представляет собой серьезную проблему, поскольку из-за медленно прогрессирующей гипергликемии у большинства пациентов симптомы на ранней стадии СД2 отсутствуют или слабо выражены. В связи с чем пациенты обращаются к врачу уже имея различные осложнения диабета, тем самым теряя время для лечения.

Существует множество факторов риска, которые влияют на развитие СД2. В зависимости от того, можно ли повлиять на тот или иной фактор риска их разделяют на модифицируемые и немодифицируемые. К немодифицируемым факторам риска относят генетику, этническую принадлежность и возраст. Например, было установлено, что у 40% родственников пациентов страдающих СД2, относящихся к первой линии родства, крайне высока вероятность развития данной патологии (Wu Y. et al., 2014). Общегеномные ассоциативные исследования показали, что имеются локусы предрасположенности к СД2, однако в отличие от стандартных клинических факторов риска они имеют незначительную прогностическую ценность в отношении развития заболевания (DeForest N., Majithia A.R., 2022). Влияние этнической принадлежности на возникновение СД2 спорно, так как несмотря на то, что у разных этнических групп наблюдались различия в расположении и частоте аллелей, повышающих риск возникновения СД2, на сегодняшний день существует мало доказательств того, что эти различия объясняют разную степень риска возникновения СД2 у разных этнических групп (Cole J.B., Florez J.C., 2020). С возрастом риск развития СД2 увеличивается, о чем свидетельствует повышение его распространения среди людей от 75 до 79 лет (Sun H. et al., 2022).

Модифицируемые факторы риска включают в себя ожирение, развивающееся вследствие приверженности к высококалорийной диете западного типа в сочетании с малоподвижным образом жизни, и вредные привычки (курение, потребление алкоголя) (Ley S.H. et al., 2016). Из них наиболее важным фактором риска является ожирение, поскольку наличие висцерального ожирения и/или эктопического жира в большей степени повышает риск развития СД2, чем вредные привычки (Kolb H., Martin S., 2017). Более того, в некоторых исследованиях

сообщалось о том, что риск развития СД2, связанный с потреблением алкоголя до конца не ясен. Предполагают, что он зависит от дозы этанола (Li M. et al., 2016). Курение, как пассивное, так и активное, напротив, значительно повышает риск развития СД2. Причем у заядлых курильщиков наблюдался самый высокий риск диабета (Pan A. et al., 2015). Следовательно, изменение образа жизни, а именно отказ от вредных привычек, потребление пищи с большим содержанием клетчатки, уменьшение продуктов с высоким гликемическим индексом и высоким содержанием насыщенных жиров, а также увеличение физической активности, является основной стратегией, позволяющей предотвратить развитие СД2.

1.2 Патогенез сахарного диабета 2 типа

1.2.1 Инсулинорезистентность

В отличие от сахарного диабета 1 типа, при котором первоначально развивается дисфункция β -клеток ПЖ вследствие их аутоиммунного разрушения, сопровождающаяся абсолютной недостаточностью секреции инсулина, при СД2 изначально развивается инсулинорезистентность (ИР), длительное течение которой приводит к дисфункции β -клеток (Ilonen J. et al., 2019). ИР — патологическое состояние, характеризующееся снижением чувствительности периферических тканей к инсулину, вследствие чего нарушается метаболизм глюкозы и поступление ее в клетки. В норме инсулин связывается с инсулиновыми рецепторами (INSR), которые в большей степени экспрессируются в жировых, мышечных клетках и гепатоцитах, что приводит к активации путей передачи сигналов инсулина и, следовательно, увеличивает поглощение глюкозы тканями-мишенями и снижает синтез глюкозы в печени (Bellavite P.A. et al., 2023). INSR представляет собой трансмембранный рецептор, который состоит из двух идентичных α - и β -субъединиц, обладающих тирозинкиназной активностью (Khan A., Pessin J., 2002). Связывание инсулина с α -субъединицей INSR вызывает фосфорилирование β -субъединицы по нескольким остаткам тирозина INSR,

приводящее к последующему фосфорилированию субстратов инсулинового рецептора (IRS) и активации пути фосфатидилинозитол-3'-киназы (PI3K)/протеинкиназы В (АКТ) (Haeusler R.A. et al., 2018). Это способствует транслокации транспортера глюкозы-4 (GLUT4) к клеточной мембране адипоцитов или миоцитов, или GLUT2 к мембране гепатоцитов и поглощению глюкозы (Haeusler R.A. et al., 2018; Leturque A. et al., 2009). Соответственно, какие-либо нарушения передачи сигналов инсулина, связанные с INSR, IRS, пути PI3K/ АКТ, приводят к развитию ИР и повышению концентрации глюкозы в крови, развивается гипергликемия. Для преодоления ИР и снижения уровня глюкозы в крови β -клетки ПЖ компенсаторно начинают секретировать большее количество инсулина, что приводит к возникновению другого симптома ИР – гиперинсулинемии. Она, при наличии сопутствующих факторов, таких как окислительный стресс и системное воспаление, способствует прогрессированию дефектов рецептора инсулина и нижележащих систем передачи сигнала инсулина, тем самым создавая замкнутый круг (Bellavite P.A. et al., 2023).

Зачастую у людей с СД2 развивается висцеральное ожирение, являющееся одним из основных факторов риска ИР, при котором наблюдается повышение уровня свободных жирных кислот (FAAs), вследствие чего нарушается обмен триацилглицеринов и β -окисление FAAs. Это приводит к образованию токсичных липидов таких как диацилглицерин (DAG) и церамид, которые участвуют в активации протеинкиназы С (PKC), ингибитора киназы ядерного фактора каппа- β (IKK β) и терминальной киназы c-Jun (JNK). Данные ферменты способствуют фосфорилированию серинового, а не тирозинового остатка субстрата инсулинового рецептора-1 (IRS-1), что приводит к нарушению сигнального пути инсулина и вызывает ИР. Кроме того, токсичные липиды вызывают окислительный стресс, стресс эндоплазматического ретикулума (ER), митохондриальную дисфункцию, что также влияет на развитие ИР и приводит к воспалению скелетных мышц, адипоцитов и β -клеток ПЖ (Chueire V.B., Muscelli E., 2021). Например, окислительный стресс, наряду с FAAs, нарушает фосфорилирование белков IRS, а также, подавляет транслокацию GLUT-4 к клеточной мембране, снижает

индуцированное инсулином перемещение IRS-1 и PI3K между цитоплазмой и микросомами, нарушает фосфорилирование PKB. Стресс ER приводит к нарушению правильного синтеза INSR, снижает экспрессию GLUT-4. При развитии митохондриальной дисфункции нарушается связь между инсулином и митохондриями, что также приводит к нарушению передачи сигналов инсулина и ИР (Yaribeygi H. et al., 2019).

Помимо повышения продукции FAAs, жировая ткань является местом выработки медиаторов воспаления, вызывающих ИР, таких как интерлейкин-6, интерлейкин-1 β , фактор некроза опухоли- α (TNF- α), моноцитарный хемотоксический белок-1 (MCP-1), С-реактивный белок (Wondmkun Y.T., 2020). Одним из основных провоспалительных цитокинов является TNF- α . Он активирует сигнальные пути IKK β , JNK, PKC, приводящие к нарушению фосфорилирование IRS, а также подавляет активацию сигнального пути PI3K/ AKT (Hou L. et al., 2021; Wondmkun Y.T., 2020; Zand H. et al., 2017). TNF- α стимулирует протеинтирозинфосфатазу 1B (PTP1B), что нарушает передачу сигналов инсулина за счет дефосфорилирования остатков фосфотирозина рецептора инсулина и IRS-1 (Ahmed B. et al., 2021; Yaribeygi H. et al., 2019).

Жировая ткань – эндокринный орган, который вырабатывает адипокины. Из них наиболее изученными являются адипонектин и лептин (Tong Y. et al., 2022). Адипонектин представляет собой жирно-специфичный коллагеноподобный белок плазмы, который экспрессируется в основном жировой тканью человека. Он повышает чувствительность к инсулину связываясь с рецепторами адипонектина 1 и 2, что приводит к активации аденозинмонофосфат-активируемой протеинкиназы (AMPK) и фосфорилированию ацетилкоэнзим-А карбоксилазы (ACC). Это способствует повышению β – окисления жирных кислот и поглощению глюкозы (Engin A., 2017). Однако с увеличением массы жировой ткани его экспрессия снижается и развивается ИР. Соответственно, снижение веса, значительно повышает уровень этого гормона и может в дальнейшем рассматриваться как одним из способов предотвращения ИР (Yadav A. et al., 2013).

Другим важным адипокином является лептин, действие которого заключается в подавлении аппетита, стимуляции термогенеза, усилении окисления жирных кислот, снижении уровня глюкозы и уменьшении массы тела и жира (Ramos-Lobo A.M., Donato J., 2017). У большинства людей с ожирением наблюдалось повышение уровня лептина без адекватного лептин-опосредованного ответа органов, в связи с чем было введено понятие «лептинорезистентность». Снижение чувствительности к лептину в головном мозге, а также в жировой ткани, мышцах, печени приводит к избыточному накоплению ТГ и приводит к развитию ИР и нарушению секреции инсулина (Peng J. et al., 2021).

Не так давно было обнаружено, что развитию ИР способствует нарушение регуляции экзосомальных микро-РНК, секретируемых макрофагами жировой ткани. (He X. et al., 2021). У людей с ожирением наблюдается активация микро-РНК-222, которая является негативным регулятором чувствительности к инсулину за счет снижения GLUT-4 опосредованного поглощения глюкозы адипоцитами (Shi Z. et al., 2014). В другом исследовании было обнаружено, что экзосомальная микро-РНК-20b-5p в большом количестве экспрессируется у пациентов с СД2 и оказывает влияние на метаболизм глюкозы в клетках скелетных мышц посредством передачи сигналов АКТ, тем самым регулируя развитие ИР (Katayama M. et al., 2019).

Еще одним важным фактором, влияющим на развитие и усугубление течения СД2, является резистентность печени к инсулину. В физиологических условиях выработка глюкозы печенью регулируется комбинированным действием глюкагона и инсулина. В то время как глюкагон индуцирует продукцию глюкозы печенью за счет глюконеогенеза и гликогенолиза, инсулин действует как мощный ингибитор продукции глюкозы, путем подавления печеночного глюконеогенеза и гликогенолиза и облегчения синтеза печеночного гликогена (Klover P.J., Mooney R.A., 2004).

Инсулин связывается с внеклеточной субъединицей рецептора инсулина в клетках-мишенях, что вызывает внутриклеточный каскад реакций, одним из звеньев которого является активация АКТ. АКТ ингибирует активность киназы гликогенсинтазы-3 (GSK-3) путем фосфорилирования, что активирует

гликогенсинтетазу и способствует синтезу гликогена. Инсулин стимулирует ацетилирование гликогенфосфорилазы, что способствует ее дефосфорилированию и ингибированию протеинфосфатазой 1, тем самым подавляя гликогенолиз. На повышение синтеза гликогена и ингибирование гликогенолиза оказывает влияние глюкозо-6-фосфат, который образуется из глюкозы под влиянием инсулина (Hatting M. et al., 2018; Rui L., 2014).

В дополнение к индуцированию синтеза гликогена и ингибированию гликогенолиза инсулин также ингибирует глюконеогенез, как за счет прямого воздействия на печень, так и за счет внепеченочных механизмов. Например, инсулин стимулирует мишень рапамицина млекопитающих-2 (mTORC2), которая фосфорилирует АКТ и усиливает ее активность. АКТ фосфорилирует и инактивирует фактор транскрипции-FOXO1 в печени, что приводит к подавлению экспрессии фосфоенолпируваткарбоксикиназы и глюкозо-6-фосфатазы, тем самым подавляя глюконеогенез. В дополнение к FOXO1 инсулин стимулирует фосфорилирование FOXO3, FOXO4 и FOXO6 с помощью АКТ и ингибирует их способность стимулировать печеночный глюконеогенез. Инсулин стимулирует фосфорилирование коактиватора гамма-рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом-1 α (PGC-1 α) с помощью АКТ и снижает его способность активировать гены глюконеогенеза (Hatting M. et al., 2018; Rui L., 2014).

При развитии ИР, возникающей вследствие нарушения передачи сигналов инсулина, гликогенолиз и глюконеогенез в гепатоцитах менее эффективно подавляются в ответ на действие инсулина, что приводит к неадекватной выработке глюкозы и снижению ее утилизации, усугубляя течение СД2 (Klover P.J., Mooney R.A., 2004).

1.2.2 Дисфункция β -клеток поджелудочной железы

Как было отмечено ранее, СД2 характеризуется не только развитием ИР, но и дисфункцией β -клеток ПЖ. Для правильного функционирования β -клетка должна быть обеспечена клеточной целостностью, а механизмы, участвующие в физиологии β -клеток, должны четко регулироваться. За выработку и секрецию инсулина, который синтезируется в виде пре-проинсулина отвечают β -клетки ПЖ. В процессе созревания пре-проинсулин подвергается конформационной модификации в ER с образованием проинсулина. После этого проинсулин перемещается из ER в аппарат Гольджи, где расщепляется на С-пептид и инсулин. После созревания инсулин хранится в инсулиновых везикулах до тех пор, пока не будут запущены реакции высвобождения инсулина, вызванные повышенной концентрацией глюкозы. Транспорт глюкозы внутрь β -клетки ПЖ происходит посредством GLUT2. Как только глюкоза поступает в клетку, активируется ее катаболизм и увеличивается внутриклеточное соотношение АТФ/АДФ, что вызывает закрытие АТФ-зависимых K^+ каналов в плазматической мембране. Это приводит к деполяризации мембраны и открытию потенциал-зависимых Ca^{2+} , вследствие чего Ca^{2+} проникает в клетку. Повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} запускает слияние инсулинсодержащих гранул с плазматической мембраной, приводящей к экзоцитозу инсулина (Galicia-Garcia U. et al., 2020).

На начальных этапах развития СД2 β -клетки ПЖ способны секретировать инсулин при высокой концентрации глюкозы в крови. По мере развития гипергликемии, гиперлипидемии и ИР возрастает размер и количество β -клеток, чтобы увеличить свою функциональную способность для удовлетворения повышенных метаболических потребностей организма. Дополнительное воздействие на β -клетки оказывают хроническое воспаление, метаболический и окислительный стресс, что в конечном итоге приводит к потере целостности островков Лангерганса и снижению массы и функции β -клеток (Demir S. et al., 2021; Galicia-Garcia U. et al., 2020; Hudish L.I., et al., 2019).

Гипергликемия и гиперлипидемия приводят к дисфункции β -клеток за счет развития окислительного стресса, приводящего к генерации активных форм кислорода (ROS), что подавляет мобилизацию Ca^{2+} и активирует проапоптотические сигналы. Повреждение β -клеток может быть вызвано стрессом ER через активацию пути апоптотического развернутого белкового ответа (UPR) (Christensen A.A., Gannon M., 2019). Активация UPR может происходить посредством нескольких механизмов, включая ингибирование Ca^{2+} – АТФазы сарко/эндоплазматического ретикулума (SERCA), ответственного за мобилизацию Ca^{2+} в ER; активацию инозитолтрифосфатных (IP_3) рецепторов или непосредственное нарушение гомеостаза ER. Кроме того, постоянно высокий уровень глюкозы увеличивает биосинтез проинсулина и островковых амилоидных полипептидов (IAPP) в β -клетках, что приводит к накоплению неправильно сформированного инсулина и IAPP и увеличению продукции ROS. Эти внутриклеточные процессы изменяют физиологическую мобилизацию Ca^{2+} в ER и способствуют проапоптотическим сигналам, деградации мРНК проинсулина и вызывают высвобождение интерлейкина-1, который усиливает локальное воспаление островков Лангерганса (Galicia-Garcia U. et al., 2020). Таким образом, дефекты синтеза любых предшественников инсулина или самого инсулина, а также нарушение механизма секреции могут привести к нарушению высвобождения инсулина β -клетками ПЖ, что может привести к нарушению целостности островков ПЖ и развитию СД2. Следовательно, необходимо поддерживать нормальное строение островков, чтобы β -клетки могли адекватно реагировать на метаболические потребности организма.

1.3 Осложнения сахарного диабета 2 типа

При длительном повышении уровня сахара в крови зачастую развиваются поздние осложнения диабета, которые в основном являются следствием повреждения сосудов и, в отличие от пациентов с сахарным диабетом 1 типа, часто выявляются у пациентов с СД2 на момент установления диагноза. В зависимости от калибра повреждающего сосуда их классифицируют на макрососудистые

осложнения (диабетическая макроангиопатия) и микрососудистые осложнения (диабетическая микроангиопатия). Макрососудистые осложнения проявляются в виде повышенного риска ишемической болезни сердца и цереброваскулярных заболеваний, в то время как микрососудистые осложнения включают диабетическую ретинопатию, диабетическую нефропатию и диабетическую периферическую нейропатию. Стоит отметить, что СД2 поражает практически все системы органов, помимо сосудистого русла, что сопровождается повреждением и дальнейшими осложнениями, которые выходят за рамки классификации, описанной выше (Maurício D. et al., 2020).

1.3.1 Макрососудистые осложнения

Одним из симптомов, который наблюдается у пациентов с СД2 является дислипидемия, характеризующаяся повышением уровня ТГ, липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), и снижением уровня липопротеидов высокой плотности (ЛПВП). Она в сочетании с хроническим воспалением и повреждением стенки сосуда приводит к развитию атеросклероза, который служит основным патологическим механизмом макрососудистых осложнений сахарного диабета, например, таких как ишемическая болезнь сердца (ИБС), сердечная недостаточность (Einarson T.R. et al., 2018). При атеросклерозе толщина интимы превышает критическую величину. В ответ на гипоксию и воспаление в микрососудах крупных артерий развивается неоваскуляризация. Эти вновь образованные микрососуды проникают из адвентиции в медию и достигают интимы в матриксе атеромных бляшек. Но из-за тонкой и слабой сосудистой стенки возможен их разрыв, приводящий к кровоизлиянию внутри бляшки, что, в свою очередь приводит к возникновению ишемического события (Galicia-Garcia U. et al., 2020; Maurício D. et al., 2020). Считается, что у пациентов с СД2 при атеросклеротическом поражении сосудов степень адвентициально обусловленной интимо-медиальной неоваскуляризации и воспаления, а следовательно, и риск сердечно-сосудистых осложнений выше, чем у недиабетических пациентов (Carter A. et al., 2007).

Среди макрососудистых осложнений ИБС чаще всего встречается у пациентов с СД2. Помимо макрососудистых заболеваний, наличие микрососудистых заболеваний также является предиктором ИБС учитывая тот факт, что большая часть объема крови миокарда приходится на микрососудистый отдел, а остальную часть составляют артерии и вены, расположенные на эпикардиальной поверхности. Кроме того, существует связь между микроангиопатией и невропатией, которая может способствовать патогенезу и прогрессированию ИБС (Maurício D. et al., 2020).

Сахарный диабет также является предрасполагающим фактором цереброваскулярных заболеваний (ЦВЗ), вызванных посредством макро- и микроваскулярных механизмов. Атеросклеротическое поражение сонных и мозговых артерий, наблюдаемое у пациентов с диабетом, может вызвать ишемию головного мозга. Наряду с этим, нарушения микроциркуляторного русла также приводят к окклюзии сосудов и инсульту за счет повреждения мелких сосудов головного мозга. Дополнительно, изменения симпатической и парасимпатической иннервации церебральных артериол, вызванные СВН, способствуют патогенезу ЦВЗ посредством неадекватной регуляции кровотока (Maurício D. et al., 2020).

В отличие от ИБС, диабетическая кардиомиопатия (ДКМП) определяется как специфическое повреждение сердца, развивающееся у пациентов с сахарным диабетом, которые характеризуются дилатацией миокарда, гипертрофией и снижением систолической и диастолической функций левого желудочка и которые не зависят от сосуществования ИБС, инфаркта миокарда, или артериальной гипертензии. В настоящее время отсутствует четкое понимание патофизиологии ДКМП, однако было предложено несколько механизмов, объясняющих эти структурные и функциональные изменения. Вероятно, они действуют синергическим образом и включают метаболические нарушения (глико- и липотоксичность), воспаление, вегетативную невропатию в форме сердечной вегетативной невропатии (СВН), а также микрососудистые и макрососудистые изменения. Гипергликемия является основным фактором развития ДКМП, поскольку она способна запускать несколько адаптивных и дезадаптивных

реакций, которые проявляются при развитии кардиальной дисфункции. Помимо влияния на сосуды, гипергликемия способствует образованию ROS, повреждению соединительной ткани, системной и локальной выработке цитокинов, активации ренин-ангиотензиноподостероидной системы, гипертрофии сердца и фиброзу (Kovacic J.C. et al., 2014).

1.3.2 Микрососудистые осложнения

Диабетическая ретинопатия является наиболее частым и хорошо изученным микрососудистым осложнением сахарного диабета и основной причиной потери зрения у пожилых людей (Fung T.H. et al., 2022). Она обусловлена дисфункцией двух основных типов клеток сетчатки: эндотелиальных клеток микроциркуляторного русла сетчатки и перицитов, лежащих под эндотелиальными клетками и регулирующих их функцию. Гипергликемия, окислительный стресс нарушают плотные контакты между эндотелиальными клетками и вызывают отслоение и апоптоз перицитов, что в конечном итоге приводит к апоптозу и повышению проницаемости гематоофтальмического барьера (Demir S. et al., 2021). Это способствует утечке множеству провоспалительных цитокинов и белков плазмы, которые приводят к образованию твердых экссудатов. По мере прогрессирования заболевания наблюдается вазоконстрикция и тромбоз капилляров, приводящие к ишемии сетчатки. Тяжелая гипоксия на терминальной стадии диабетической ретинопатии приводит к неоваскуляризации, кровоизлияниям в стекловидное тело и отслойке сетчатки (Lin K.Y. et al., 2020).

Диабетическая нефропатия обусловлена нарушением почечной микроциркуляции, что ведет к структурным и функциональным повреждениям клубочков, которые объективно определяется повышенным артериальным давлением, снижением скорости клубочковой фильтрации и альбуминурией. Диабетическая нефропатия является основной причиной хронической болезни почек во всем мире (Alicic R.Z. et al., 2017). Поскольку фибробласты соединяют сосуды с эпителиальными клетками канальцев, сахарный диабет, помимо гломерулярного аппарата, также повреждает почечные канальцы. Это проявляется

дегенерацией эпителия, накоплением миофибробластов, узловым или диффузным гломерулосклерозом, тубулоинтерстициальным воспалением, фиброзом, атрофией канальцев и гиалинозом почечных артериол (Lin Y.C. et al., 2018).

У половины больных сахарным диабетом возникают осложнения со стороны вегетативной и периферической нервной системы, известные как диабетическая нейропатия. Она возникает из-за сочетания микрососудистой дисфункции и нейронального дефицита. Повреждение *vasa nervorum* вследствие вазоконстрикции, утолщения базальной мембраны капилляров и гиперплазии эндотелия приводит к эндоневральной гипоксемии и гипоперфузии нервов. Кроме того, метаболическое клеточное повреждение, вызванное длительным влиянием гипергликемии и дислипидемии, также способствует повреждению нервных волокон. Сочетание метаболических и сосудистых нарушений приводит к гипоперфузии и дисфункции нервов, и, в конечном итоге, вызывает апоптоз нейронов, шванновских и глиальных клеток (Freeman R., 2014; Mauricio D. et al., 2020). Наиболее распространенная форма диабетической невропатии — дистальная симметричная полинейропатия. При этом происходит поражение чувствительных нервных окончаний рук и нижних конечностей, проявляющееся болью, жжением, покалыванием, а также онемением. По мере прогрессирования заболевания повреждаются двигательные нервные окончания нижних конечностей, что приводит к потере равновесия и онемению стопы с потерей чувствительности. Кроме того, возможно поражение вегетативных нервных волокон, иннервирующих сердце и сосуды, в результате чего развивается сердечная вегетативная невропатия (СВН), нарушение моторики желудочно-кишечного тракта, диабетическая цистопатия и импотенция (Feldman E. L. et al., 2019).

1.3.3 Неклассифицированные осложнения

Помимо микро- и макроvasкулярных осложнений, существуют неклассифицированные на сегодняшний момент осложнения диабета. К ним

относится микроваскулярные легочные осложнения, неалкогольная болезнь печени и рак.

Влияние сахарного диабета на функции легких до конца не изучено, тем не менее легкие были предложены в качестве еще одного органа-мишени. У больных СД2 посмертно в гистологическом исследовании были обнаружены легочная микроангиопатия, утолщение базальных пластинок легочных капилляров и альвеолярного эпителия (Колодова И.М. и др., 1982). Кроме того, у диабетических пациентов также наблюдались нарушение бронхомоторного тонуса, снижение вентиляционной реакции на гипоксию, снижение силы дыхательных мышц и более низкие пики поглощения кислорода в кардиопульмональном нагрузочном тесте (Roberts T.J. et al., 2018). Сообщалось, что контроль гликемии у пациентов с СД2 улучшает функцию легких, измеренную согласно спирометрическим параметрам (Gutierrez-Carrasquilla L. et al., 2019).

Зачастую, совместно с сахарным диабетом развивается НАЖБП, характеризующаяся избыточным накоплением липидов в гепатоцитах в виде ТГ (жировая дистрофия печени), которое не связано с употреблением алкоголя (Raza S. et al., 2021). Частота встречаемости НАЖБП у пациентов с СД2 составляет 56% (Targher G. et al., 2021). В случае НАЖБП резистентность к инсулину приводит к липолизу жировой ткани и увеличению содержания ненасыщенных жирных кислот в крови, которые накапливаются в печени в виде ТГ, а также к липогенезу *de novo* в печени, в результате чего углеводы метаболизируются в жирные кислоты и также захватываются печенью. Со временем, липотоксичность, дисбаланс цитокинов и адипокинов, митохондриальная дисфункция и воспаление способствуют развитию неалкогольному стеатогепатиту (НАСГ), приводящему к циррозу печени (Bugne C.D., Targher G., 2015).

Диагностика НАЖБП затруднена поскольку у подавляющего большинства пациентов, включая пациентов с компенсированным циррозом печени, данное заболевание протекает бессимптомно и никак не отражается на лабораторных показателях (Friedman S.L. et al., 2018). Таким образом, НАЖБП может прогрессировать до стадии цирроза при отсутствии установленного диагноза.

Обычно НАЖБП ставится случайно при УЗИ органов брюшной полости в случае наличия стеатоза $>20\%$ от массы печени или повышении аминотрансфераз. Реже НАЖБП можно заподозрить при наличии сопутствующих метаболических заболеваний, например, таких как СД2 (Friedman S.L. et al., 2018). Эталонным стандартом диагностики НАЖБП является биопсия печени, однако это инвазивный и дорогостоящий метод. К тому же образец составляет всего $\sim 1/50000$ объема печени, что может привести к ложноотрицательному результату из-за гетерогенности печени при НАЖБП (Jennison E. et al., 2019). Следовательно, для того чтобы предотвратить или замедлить прогрессирование НАЖБП эффективнее начинать лечение на этапе постановки диагноза СД2.

Лечение НАЖБП в основном направлено на изменение образа жизни: увеличение физической активности и снижение калорийности пищи. В случае потери веса на 5-6% снижается стеатоз печени, тогда как потеря веса $>10\%$ способствует улучшению НАСГ и снижению фиброза печени (Targher G. et al., 2021). Однако этот метод лечения не может быть успешно реализован у большинства пациентов из-за отсутствия каких-либо улучшений состояния печени несмотря на выполнение рекомендаций врача, а также из-за постановки диагноза на поздней стадии заболевания, когда имеется выраженный фиброз печени. В этом случае рекомендовано фармакологическое лечение, направленное на уменьшение воспаления печени, фиброза и стеатогепатита, а также снижение сердечно-сосудистого риска (Raza S. et al., 2021). Согласно клиническим рекомендациям, утвержденным Минздравом РФ для лечения НАЖБП применяются следующие препараты для лечения заболеваний желчевыводящих путей, обладающие гепатопротекторным действием: альфа-токоферола ацетат, урсодезоксихолевая кислота, фосфолипиды, адеметионин, орнитин, экстракт плодов расторопши пятнистой, турин, лаеннек, морфолиний-метил-триазилил-тиоацетат (Общероссийская общественная организация «Российское научное медицинское общество терапевтов», Научное общество гастроэнтерологов России, 2022). Однако в иностранных источниках литературы отмечают, что в настоящее время нет ни одного класса лекарственных препаратов, одобренного для лечения НАЖБП

(Powell E.E. et al., 2021; Zhang C., Yang M., 2021). Исходя из этого до сих пор ведется поиск эффективных гепатопротекторных препаратов. Учитывая этот факт, в качестве потенциальных средств для лечения НАЖБП могут рассматриваться гипогликемические, гиполипидемические и противовоспалительные средства, антиоксиданты, модуляторы ядерных факторов транскрипции и др. (Pafili K., Roden M., 2021; Singh S. et al., 2017). Из них искомой активностью обладали: агонист рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (PPAR) γ – пиоглитазон, двойной агонист PPAR α/γ – сароглитазар, витамин E, ингибиторы SGLT2 – канаглифлозин, дапаглифлозин и эмпаглифлозин, агонист фарнезоидного X-рецептора – обетихоловая кислота (Pafili K., Roden M., 2021; Powell E.E. et al., 2021; Singh S. et al., 2017). Для снижения сердечно-сосудистого риска рекомендуют использовать статины, хотя они не оказывают заметного гистологического влияния на НАЖБП (Powell E.E. et al., 2021; Zhang C., Yang M., 2021).

Предполагается, что существует тесная связь между сахарным диабетом (особенно СД2) и канцерогенезом. СД2 повышает риск развития рака ПЖ, печени, молочной железы, эндометрия, мочевого пузыря и почек, а также развития неходжкинской лимфомы. Основными факторами риска заболеваемости раком при сахарном диабете являются гипергликемия, гиперинсулинемия, инсулинорезистентность и хроническое воспаление, вызванное ожирением (Wojciechowska J. et al., 2016). Например, гипергликемия способствует повышению пролиферации раковых клеток, снижению апоптоза, увеличению миграции и инвазии, а также активации онкогенных путей (Ryu T.Y. et al., 2014). Кроме того, она способствует метастазированию, периневральной инвазии и резистентности опухолевых клеток к химиотерапии (Duan W. et al., 2014).

1.4 Лечение сахарного диабета 2 типа

Поскольку ожирение является основным фактором риска развития СД2, одной из первых стратегий лечения, рекомендуемых пациентам с впервые диагностированным сахарным диабетом, является изменение образа жизни, включающее коррекцию питания и увеличение физических упражнений.

Низкокалорийная диета способствует снижению массы тела за счет уменьшения общего количества жира в организме, снижения висцерального жира и внутрипеченочного содержания липидов (Magkos F. et al., 2016). Доказано, что снижение массы тела на 5% повышает чувствительность печени и мышц к инсулину, улучшает функцию β -клеток и снижает концентрацию глюкозы и инсулина в крови натощак. Дополнительная потеря веса (на 11–16% от исходной массы тела) еще больше улучшает функцию β -клеток и чувствительность тканей к инсулину, а также снижает содержание ТГ в печени и экспрессию в адипоцитах генов, участвующих в переносе холестерина, синтезе липидов, ремоделировании внеклеточного матрикса и окислительном стрессе (Magkos F. et al., 2016). Наряду с диетой, физические упражнения являются важной составляющей всех программ профилактики сахарного диабета и ожирения. Упражнения, будь то аэробные упражнения, силовые или высокоинтенсивные интервальные тренировки или их комбинация, способствуют улучшению гликемического контроля, передачи сигналов инсулина и уровня липидов в крови (Kirwan J.P. et al., 2017). В связи с тем, что одни пациенты с СД2 не нацелены на модификацию образа жизни, другие несмотря на изменения питания и физической активности не достигают целевого уровня глюкозы в крови возникает потребность в медикаментозной терапии.

В настоящее время для лечения СД2 применяют следующие противодиабетические препараты (Аляутдин Р.Н., 2020):

1. Препараты, стимулирующие секрецию инсулина

- Производные сульфонилмочевины
- Глиниды
- Инкретиномиметики
 - Аналоги GLP-1
 - Ингибиторы DPP-4

2. Препараты, уменьшающие инсулинорезистентность тканей:

- Бигуаниды
- Тиазолидиндионы

3. Препараты, препятствующие всасыванию глюкозы в кишечнике (ингибиторы α -глюкозидазы)

4. Ингибиторы SGLT2

1.4.1 Препараты сульфонилмочевины и глиниды

Препараты сульфонилмочевины являются препаратами второй линии для лечения СД2, которые действуют непосредственно на островковые β -клетки. Они связываются с рецепторами сульфонилмочевины в результате чего происходит закрытие АТФ-зависимых K^+ каналов и уменьшение выхода ионов калия. Мембрана клетки деполяризуется, что вызывает открытие потенциал зависимых Ca^{2+} каналов и увеличение притока Ca^{2+} в β -клетки, способствуя выделению инсулина из секреторных гранул (Lv W. et al., 2019). Существует несколько поколений препаратов сульфонилмочевины: препараты 1-го поколения включают толбутамид, хлорпропамид, толазамид, ацетогексамид, препараты 2-го поколения – глибенкламид, глипизид, глимепирид. В настоящее время в клинике используют только препараты сульфонилмочевины 2-го поколения, ввиду развития нежелательных побочных эффектов, таких как увеличение веса, низкое сродство к рецепторам, риск гипогликемии и ССО у средств 1-го поколения. Препараты 2-го поколения также имеют большую эффективность, более быстрое начало действия, короткий период полувыведения и большую продолжительность действия (Lv W. et al., 2019; Padhi S. et al., 2020).

Как правило, при лечении препаратами сульфонилмочевины наблюдаются такие побочные эффекты как запор, диарея, рвота и тошнота, и увеличение веса. Наиболее серьезным побочным эффектом препаратов этой группы является гипогликемия, которая включает следующие симптомы: сонливость, недостаток энергии, головокружение, потливость и головная боль. Большой риск развития гипогликемии имеют препараты длительного действия (например, глибенкламид), в связи с чем они не рекомендованы пожилым пациентам. В качестве альтернативы препаратам длительного действия рекомендуют использовать препараты более короткого действия (например, толбутамид) (Hossain Md. A., Pervin R. 2018).

Глиниды (также известные как меглитиниды) представляет собой еще один класс препаратов, которые повышают секрецию инсулина. К ним относят рапеглинид и натеглинид. Они стимулирует секрецию инсулина, блокируя АТФ-зависимые K^+ каналы на мембране β -клетки, что приводит к ее деполяризации, открытию Ca^{2+} каналов и усилению притока Ca^{2+} в клетку, что приводит к секреции инсулина. Однако, в отличие от препаратов сульфонилмочевины, глиниды стимулируют секрецию инсулина только при высокой концентрации глюкозы в крови, что снижает риск гипогликемии. Тем не менее, риск гипогликемии все равно сохраняется у этой группы препаратов, особенно характерный для репаглинида. Глиниды не оказывают существенного влияния на изменение массы тела (Lv W. et al., 2019; Padhi S. et al., 2020).

1.4.2 Инкретиномиметики

Инкретины — это гормоны, которые секретируются энтероэндокринными клетками кишечника в ответ на прием питательных веществ и стимулируют секрецию инсулина при высокой концентрации глюкозы в крови. Наиболее изученными инкретинами являются GIP (глюкозозависимый инсулиотропный полипептид), секретируемый К-клетками кишечника, и GLP-1, секретируемый L-клетками. Их действие направлено на повышение секреции инсулина за счет активации соответствующих рецепторов, связанных с G-белком, которые экспрессируются на β -клетках ПЖ (Holst J.J., 2019; Nauck M.A, Meier J.J., 2018).

Для лечения СД2 применяют следующие инкретиномиметики: агонисты рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1R) и ингибиторы фермента DPP-4. В ПЖ GLP-1 взаимодействует с GLP-1R, связанным с $G\alpha_s$ -белком, в результате чего активируется аденилатциклаза, которая стимулирует превращение АТФ в цАМФ, тем самым повышая его концентрацию. В свою очередь, цАМФ дополнительно активирует протеинкиназу А и фактор обмена гуаниновых нуклеотидов Rap 4 (RAPGEF4). В результате активации этих факторов увеличивается внутриклеточная концентрация Ca^{2+} , тем самым способствуя высвобождению везикул инсулина в кровь посредством экзоцитоза (Müller T.D. et

al., 2019). Однако период полураспада GLP-1 очень короткий и составляет примерно 1-2 минуты, что обусловлено действием фермента DPP-4. Таким образом, ингибирование DPP-4 предотвращает деградацию GLP-1 и усиливает его инсулинотропное действие, что приводит к улучшению гликемического контроля. Важно отметить, что GLP-1 проявляет свой эффект только при повышении концентрации глюкозы в крови, что, по сравнению с препаратами сульфонилмочевины, значительно снижает риск гипогликемии (Deacon C.F., 2020).

Поскольку GLP-1 имеет короткий период полураспада, он не подходит для длительного лечения пациентов с СД2. Биохимическая модификация нативного пептида позволила увеличить экспозицию и время действия агонистов GLP-1R. Таким образом было создано несколько производных GLP-1 с улучшенной биодоступностью и длительным действием. Эти препараты включают эксенатид, ликсисенатид, лираглутид, дулаглутид, альбиглутид и семаглутид (Müller T.D. et al., 2019). Учитывая, что короткий период полураспада GLP-1 обусловлен ферментом DPP-4, были разработаны различные обратимые ингибиторы DPP-4: вилдаглиптин, ситаглиптин, саксаглиптин, линаглиптин, дутоглиптин и алоглиптин (Deacon C.F., 2020).

Помимо гипогликемического действия, агонисты GLP-1R и ингибиторы DPP-4 снижают секрецию глюкагона α -клетками ПЖ, повышают пролиферацию β -клеток и уменьшают их апоптоз, снижают продукцию глюкозы печенью. Было установлено, что они снижают риск ССО, оказывают нейропротекторное, нефропротекторное и противовоспалительным действием. Еще одним из важных эффектов этих препаратов является снижение эвакуаторной функции желудка, активация центра насыщения и угнетение центра голода в гипоталамусе, в результате чего снижается аппетит и потребление пищи, что приводит к потере веса (Zhao X. et al., 2021).

Основными побочными эффектами агонистов GLP-1R и ингибиторов DPP-4 являются желудочно-кишечное расстройство, проявляющееся в виде тошноты, рвоты, диареи. При применении агонистов GLP-1R может возникнуть реакция в

месте инъекции препарата, головная боль, назофарингит, однако эти эффекты не приводят к отмене препарата (Filippatos T.D. et al., 2014; Wu S. et al., 2017).

1.4.3 Бигуаниды

Бигуаниды – один из основных классов противодиабетических препаратов, единственным представителем которых в настоящее время является метформин, применяемый в качестве препарата первой линии в лечении сахарного диабета из-за своего выраженного сахароснижающего действия, хорошего профиля безопасности и относительно низкой стоимости (Sanchez-Rangel E., Inzucchi S.E., 2017). Гипогликемическое действие метформина проявляется за счет снижения продукции глюкозы печенью (ингибирования глюконеогенеза и гликогенолиза), а также увеличения инсулин-опосредованного захвата глюкозы скелетными мышцами (Hossain Md. A., 2018). Тем не менее точный механизм действия метформина остается неизвестным. Предполагается, что основными механизмами, с помощью которых метформин регулирует печеночный глюконеогенез являются (Lamoia T.E., Shulman G.I., 2021):

- ингибирование комплекса I;
- повышение гепатоцеллюлярного окислительно-восстановительного потенциала цитозоля.

Ингибирование комплекса I (рисунок 1) (Lamoia T.E., Shulman G.I., 2021) занимает ведущее место среди нескольких предполагаемых механизмов действия метформина. Основной мишенью, на которую действует метформин внутри клетки являются митохондрии, где он ингибирует комплекс I митохондриальной цепи переноса электронов и снижает окисление НАДН, в результате чего равновесие АТФ:АДФ:АМФ смещается в сторону увеличения синтеза АМФ аденилаткиназой, тем самым снижая энергетический заряд клетки. Повышенные уровни АМФ активируют AMPK, что приводит к ингибированию цАМФ-чувствительного элемент-связывающего белка 1 – регулируемого коактиватором транскрипции 2 (CRTC2) и снижению экспрессии генов глюконеогенеза. AMPK также фосфорилирует и ингибирует АСС, что способствует окислению жиров и

снижению липогенеза. Кроме того, предполагается, что существуют пути, в которых повышенный уровень АМФ ингибирует глюконеогенез в печени независимо от AMPK, а именно он блокирует активацию фруктозы-1,6-бисфосфатазы (FBP1), подавляя глюконеогенез, и предотвращает стимулированную глюкагоном выработку цАМФ, тем самым противодействуя действию глюкагона в печени. Таким образом, возникающее в результате ингибирования комплекса I снижение продукции АТФ и повышение уровня АМФ, вероятно, способствуют активации AMPK, ингибированию FBP1 и индуцированного глюкагоном синтеза цАМФ, что в итоге приводит к подавлению глюконеогенеза в печени (Lamoia T.E., Shulman G.I., 2021; Pernicova I., Korbonits M., 2014).

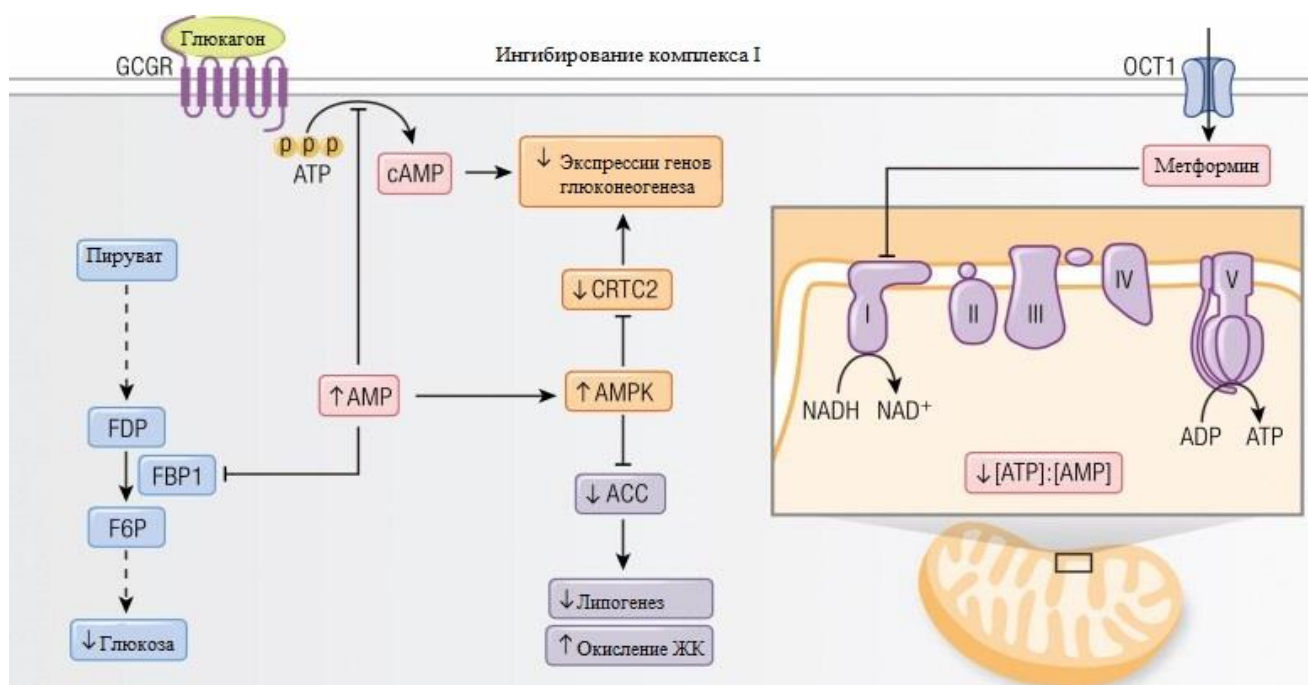


Рисунок 1 – Предполагаемый механизм действия метформина, связанный с ингибированием комплекса I. АСС, ацетил-КоА-карбоксилаза; AMPK, аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа; CRTС2, цАМФ-чувствительный элемент-связывающий белок 1 (CREB) – регулируемый коактиватором транскрипции 2; FBP, фруктозо-1,6-бисфосфатаза; FDP, фруктозо-1,6-дифосфат; F6P, фруктозо-6-фосфат; OCT1, переносчик органических катионов 1

Другой механизм действия метформина направлен на повышение окислительно-восстановительного потенциала цитозоля за счет ингибирования глицерол-3-фосфатдегидрогеназы-2 (GPD2) в печени (рисунок 2) (Lamoia T.E.,

Shulman G.I., 2021). Обычно глицерин фосфорилируется в печени до глицерол-3-фосфата (G3P) и превращается в дигидроксиацетонфосфат (DHAP) с помощью GPD2. Таким образом, GPD2 необходима для включения глицерина в путь глюконеогенеза. Метформин ингибирует GPD2, что снижает превращение G3P в DHAP и нарушает глюконеогенез из глицерина и одновременно увеличивает цитозольное соотношение $[NADH]:[NAD^+]$. Это приводит к ингибированию лактатдегидрогеназы и снижает глюконеогенез из лактата (Lamoia T.E., Shulman G.I., 2021).

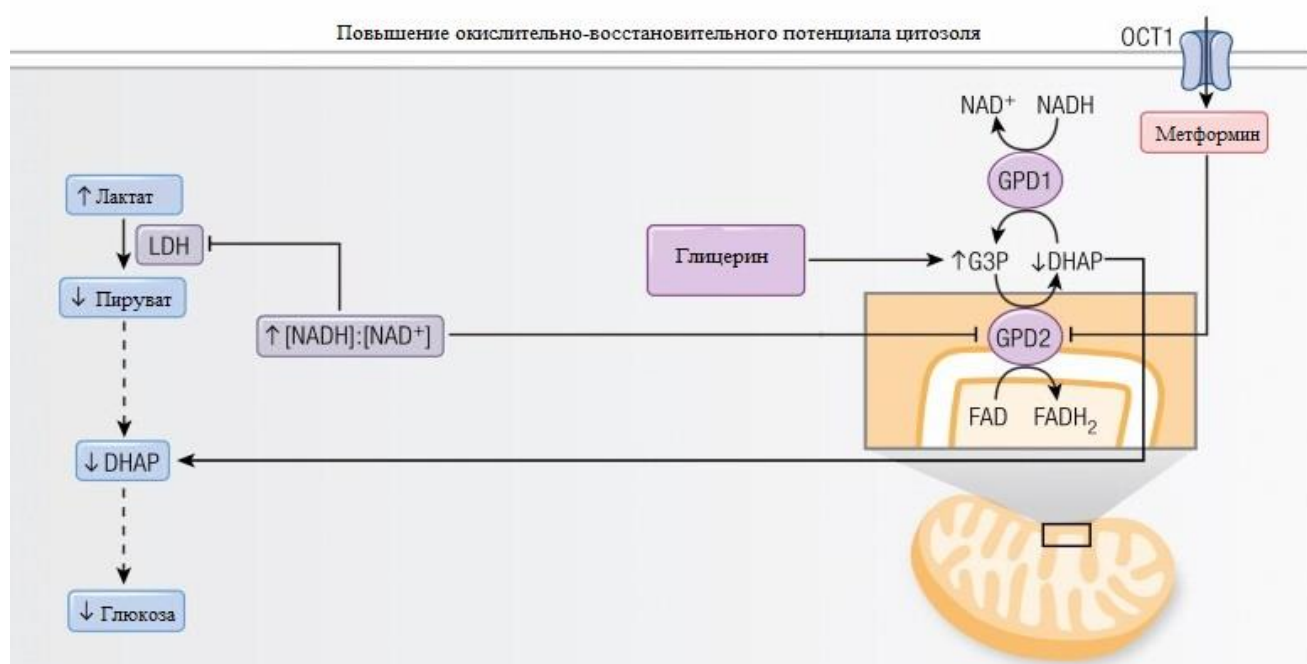


Рисунок 2 – Реакции, приводящие к повышению окислительно-восстановительного потенциала цитозоля за счет ингибирования метформином GPD2 в печени. DHAP, дигидроксиацетонфосфат; G3P, глицерол-3-фосфат; GPD, глицерол-3-фосфатдегидрогеназа; LDH, лактатдегидрогеназа; FAD, флавинадениндинуклеотид; OCT1, переносчик органических катионов 1

Метформин также может снижать уровень ТГ и общего холестерина (ОХ) в крови. Его длительное применение может не только улучшить симптомы гипергликемии, но и способствовать снижению веса у диабетических пациентов с ожирением, который придерживаются низкокалорийной диеты. Предполагают, что этот эффект связан с активацией фактора роста/дифференцировки 15 (GDF15) в печени, который взаимодействует с α -подобным рецептором семейства глиального

нейротрофического фактора (GFRAL) в задней части мозга, подавляя аппетит, регулируя массу тела и энергетический баланс (Liu J. et al., 2023). Тем не менее, в клинических руководствах метформин не был указан и рекомендован как препарат, снижающий вес.

Распространенным побочным эффектом метформина является непереносимость со стороны желудочно-кишечного тракта, которая вызывает такие симптомы как боль в животе, метеоризм и диарея (Nabrdalik K. et al., 2022). У пациентов, длительно принимающих метформин, был обнаружено снижение уровня витамина B12, что может привести к гематологическим нарушениям (например, мегалобластной анемии и образованию гиперсегментированных нейтрофилов), прогрессирующей демиелинизации аксонов и периферической невропатии (Infante M. et al., 2021). Наиболее опасным для жизни нежелательным эффектом метформина является лактоацидоз. Однако зарегистрированная частота лактоацидоза в клинической практике оказалась очень низкой (<10 случаев на 100 000 пациентов в год). Как правило метформин-ассоциированный лактоацидоз встречается у пациентов с почечной недостаточностью из-за повышения концентрации метформина в плазме, а также при состояниях, которые нарушают выработку и клиренс лактата (например, цирроз печени, сепсис или гипоперфузия) (Defronzo R. et al., 2016).

1.4.4 Тиазолидиндионы

Тиазолидиндионы (TZD) оказывают первичное воздействие на жировую ткань и снижают резистентность к инсулину за счет уменьшения уровня ТГ в печени, массы висцерального жира и увеличения подкожного жира (Lebovitz H.E., 2019). Помимо этого, они повышают уровень адипонектина в крови, увеличивают инсулинозависимое поглощение глюкозы мышцами и жировой тканью, снижают глюконеогенез в печени (Eggleton J.S., Jialal I., 2020).

Механизм действия TZD опосредован активацией ядерного рецептора, активируемого пролифератором пероксисом – PPAR γ , в результате чего возникают конформационные изменения, изменяющие экспрессию генов многочисленных

путей, участвующих в регуляции метаболизма, включая липопротеинлипазу, глюкокиназу, ацил-КоА-синтазу и другие. Улучшение резистентности к инсулину происходит за счет увеличения адипонектина, экспрессии GLUT4 и блокирования действия TNF- α в адипоцитах. Повышенная экспрессия GLUT4 увеличивает поглощение глюкозы адипоцитами и клетками скелетных мышц в ответ на инсулин (Eggleton J.S., Jialal I., 2020).

В клинической практике используются два TZD, розиглитазон и пиоглитазон, в качестве монотерапии или в сочетании с метформином или препаратами сульфонилмочевины. У них существует несколько нежелательных побочных эффектов: повышенная задержка жидкости, увеличение веса, снижение плотности костной ткани и увеличение риска переломов. Помимо этого, существуют опасения о том, что росиглитазон повышает риск развития ССО, а пиоглитазон – риск развития рака мочевого пузыря, в связи с чем имеются некоторые ограничения при применении данных препаратов. Следовательно, перед назначением TZD необходимо обсуждать с пациентами сопоставление риска и пользы, а также использования альтернативных гипогликемических препаратов (Giglio R.V. et al., 2022; Hossain Md. A., 2018).

1.4.5 Ингибиторы α -глюкозидазы

Ингибиторы α -глюкозидазы – это пероральные гипогликемические препараты, механизм действия которых связан с конкурентным и обратимым ингибированием кишечной α -глюкозидазы, представляющей собой фермент верхних отделов желудочно-кишечного тракта, расщепляющий поли- и дисахариды до глюкозы. При ингибировании этого фермента нарушается всасывание глюкозы в кишечнике, что приводит к улучшению контроля гликемии. К ингибиторам α -глюкозидазы относят акарбозу, миглитол и воглибозу. Два из них – акарбозу и миглитол – используют в качестве монотерапии или в комбинации с другими гипогликемическими препаратами. Считается, что ингибиторы α -глюкозидазы стоит рассматривать в качестве монотерапии в том случае, когда противопоказан метформин или сложно достичь целевого уровня HbA1c в течение

3-6 месяцев лечения препаратами первой (метформин) и второй (ингибиторы DPP-4, агонисты GLP-1R или ингибиторы SGLT-2) линии (Hedrington M.S., Davis S.N., 2019; Rappachan J.M. et al., 2019).

Ингибиторы α -глюкозидазы обладают низким риском гипогликемии и почти не влияют на массу тела. Наиболее распространенными побочными эффектами являются желудочно-кишечные расстройства (боль в животе, диарея, метеоризм). Диета с высоким содержанием углеводов может усугубить эти побочные эффекты. В связи с необходимостью многократного ежедневного приема и плохой переносимостью их назначают редко (Hedrington M.S., Davis S.N., 2019; Hossain Md. A., 2018).

1.4.6 Ингибиторы натрий-глюкозного котранспортера-2

Глюкоза, будучи полярным соединением, реабсорбируется в проксимальных извитых канальцах почек с помощью транспортеров глюкозы. Существует два натрий-глюкозных ко-транспортера: SGLT1 и SGLT2. Основным транспортером, ответственным за реабсорбцию глюкозы в почках, является SGLT2, расположенный на апикальной мембране проксимальных извитых канальцев почек. Для лечения диабета были разработаны высокоселективные конкурентные ингибиторы SGLT2 (глифлозины), которые препятствуют реабсорбции глюкозы в проксимальных канальцах почек и способствуют глюкозурии, тем самым снижая концентрацию глюкозы в крови (Garcia-Ropero A. et al., 2018; Perry R.J., Shulman G.I., 2020). Помимо гипогликемического действия ингибиторы SGLT2 снижают массу тела, артериальное давление, частоту развития сердечной недостаточности, риск смертности от ССЗ и улучшают функции β -клеток. Также они повышают уровень ЛПНП и ЛПВП, снижают уровень ТГ и содержание мочевой кислоты (Perry R.J., Shulman G.I., 2020; Xu B. et al., 2022).

В настоящее время применяют следующие глифлозины: эмпаглифлозин, канаглифлозин, дапаглифлозин и эртуглифлозин. Их назначают в качестве монотерапии, так и в комбинации с другими гипогликемическими препаратами. Риск возникновения гипогликемии при лечении ингибиторами SGLT2 очень низок.

Однако он повышается при сочетании глифлозинов с препаратами сульфонилмочевины (Garcia-Ropero A. et al., 2018; Perry R.J., Shulman G.I., 2020).

При длительном лечении ингибиторами SGLT2 было отмечено увеличение инфекций мочеполовой системы, чаще встречающихся у женщин. Из-за незначительного мочегонного эффекта глифлозины повышают риск ортостатической гипотензии, постурального головокружения и обезвоживания (особенно у пожилых пациентов или при одновременном применении петлевых диуретиков). Кроме того, осмотический диурез может привести к увеличению гематокрита, вязкости крови и повысить риск образования тромбозов. В некоторых исследованиях сообщалось, что ингибиторы SGLT2 могут вызывать диабетический кетоацидоз. Таким образом, перед назначением глифлозинов, как и любых лекарственных препаратов, необходимо учитывать их преимущества и недостатки (Singh M., Kumar A., 2018; Xu B. et al., 2022).

Таким образом, множественные факторы риска сахарного диабета 2 типа, поздняя постановка диагноза после развития микро- и макрососудистых осложнений, недостатки существующих методов терапии обуславливают необходимость разработки новых гипогликемических препаратов, в том числе влияющих на новые молекулярные мишени.

1.5 Новые молекулярные мишени для лечения сахарного диабета 2 типа

В настоящее время активно разрабатываются новые препараты для лечения сахарного диабета 2 типа, которые можно разделить на 4 группы, учитывая их влияние на основные физиологические пути снижения сахара в крови (Perreault L. et al, 2021):

1. непосредственно действующие на β -клетки ПЖ и стимулирующие секрецию инсулина: активаторы глюкокиназы в ПЖ и печени, агонисты FFAR1;
2. влияющие на инкретиновую ось: двойные агонисты рецепторов GLP-1-глюкагона и GLP-1-GIP, тройные агонисты рецепторов GLP-1-GIP-глюкагона; аналоги оксинтомодулина; агонисты рецептора, связанного с G-белком – 19;

3. снижающие выработку глюкозы печенью или повышающие ее потребление печенью: антагонисты рецептора глюкагона, ингибиторы антисмысловых олигонуклеотидов рецептора глюкагона, двойные агонисты амилин-кальцитонинового рецептора и гепатоселективные активаторы глюкокиназы;

4. повышающие чувствительность тканей к инсулину: антисмысловые олигонуклеотидные ингибиторы мРНК протеинтирозинфосфатазы 1B; аналоги фактора роста фибробластов 21, ингибиторы диацилглицеролацетилтрансферазы 1; ингибиторы энтероцитарного микросомального белка-переносчика ТГ и др.

Одной из многообещающих молекулярных мишеней для лечения СД2 является FFAR1 (также известный как рецептор, связанный с G белком 40). Он представляет собой трансмембранный рецептор, связанный с G-белком, высоко экспрессируемый в β -клетках ПЖ, и энтероэндокринных L-, K- и I-клетках кишечника (Chen C. et al., 2016). Агонисты FFAR1 активируют этот рецептор и инициируют сигнальный путь $G\alpha_q$ в β -клетках ПЖ, характеризующийся зависимым от фосфолипазы C синтезом DAG и IP3. IP3 повышает внутриклеточное высвобождение Ca^{2+} , тогда как DAG активирует PKC, которая инициирует ремоделирование цитоскелета, необходимое для секреторной активности клетки. Эти процессы, в конечном итоге, стимулируют секрецию инсулина глюкозозависимым способом, благодаря чему у агонистов FFAR1, подобно агонистам GLP-1R и ингибиторам DPP-4, отсутствует риск развития гипогликемии (Governa P. et al., 2021; Li Z. et al., 2018).

В энтероэндокринных клетках агонисты FFAR1 инициируют сигнальный путь $G\alpha_q$, описанный выше, и $G\alpha_s$. Диссоциированная субъединица $G\alpha_s$ активирует аденилатциклазу, что приводит к увеличению цАМФ, который впоследствии активирует цАМФ-зависимую протеинкиназу A и увеличивает внутриклеточное содержание Ca^{2+} . Одновременная активация $G\alpha_q$ и $G\alpha_s$ индуцирует высвобождение инкретиновых гормонов, а именно, GLP-1, GIP и холецистокинина энтероэндокринными L, K и I клетками соответственно (Governa P. et al., 2021; Li Z. et al., 2018).

В зависимости от взаимодействия агонистов FFAR1 с β -клетках ПЖ и энтероэндокринными клетками кишечника выделяют частичные и полные агонисты FFAR1. Частичные агонисты стимулируют секрецию инсулина только за счет взаимодействия с β -клетками ПЖ, тогда как полные агонисты одновременно взаимодействуют с β -клетками и энтероэндокринными L, K клетками кишечника, что приводит к выработке инкретинов и дополнительно усиливает секрецию инсулина, а также оказывает влияние на снижение массы тела. Исходя из этого полные агонисты FFAR1 обладают преимуществом в отношении контроля гликемии по сравнению с частичными агонистами FFAR1 и, вероятно, будут оказывать лучший эффект для лечения СД2 (Hauge M. et al., 2015; Li Z. et al., 2020).

Большая часть агонистов FFAR1 содержит фармакофорный фрагмент ФПК, в параположении которой находится короткий линкер, связывающий ФПК с ароматическим фрагментом, в котором также могут находиться дополнительные алифатические или ароматические заместители (Mikami S. et al., 2012). За последние несколько лет было разработано множество синтетических агонистов FFAR1, из которых только несколько соединений достигли стадии клинических испытаний. Наиболее изученными из них являются следующие частичные агонисты: TAK-875 (достиг 3 стадии КИ), LY2881835 (достиг 1 стадии КИ), AMG 837 (достиг 1 стадии КИ) (рисунок 3). Однако их дальнейшее исследование было прекращено в связи с гепатотоксичностью (Li Z. et al., 2020). Тем не менее поиск новых агонистов FFAR1 продолжается. Например, сообщалось о разработке нового частичного агониста FFAR1 – CPL207280, проявляющего гипогликемическое действие на животных моделях СД2, а также не оказывающего никаких вредных эффектов на печень здоровых и больных диабетом животных. Благодаря этому существует возможность создать эффективный и безопасный агонист FFAR1 (Bazydlo-Guzenda K. et al., 2021).

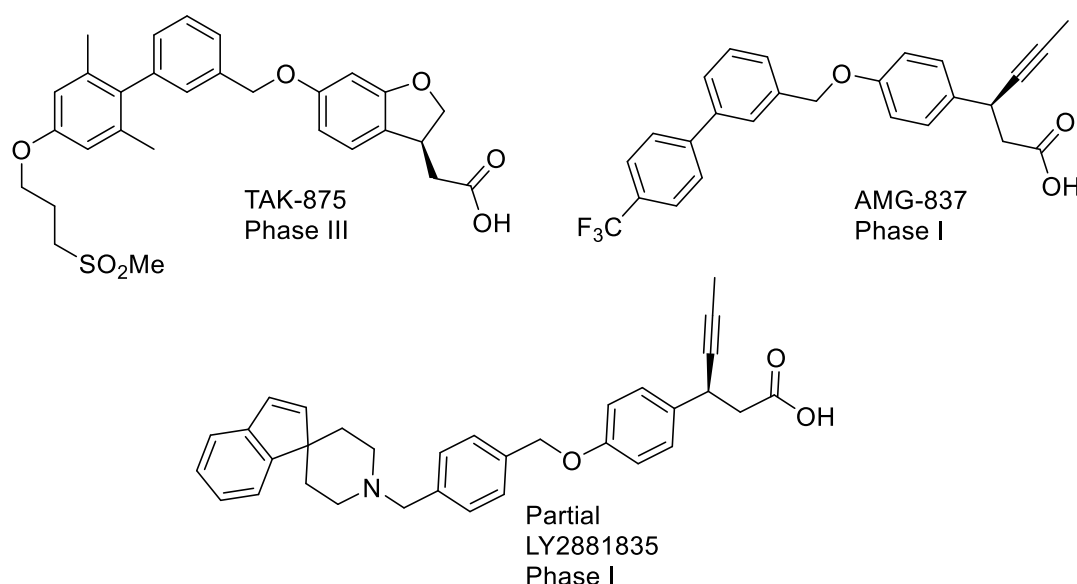


Рисунок 3 – Синтетические частичные агонисты FFAR1

После ряда неудач, связанных с частичными агонистами FFAR1, был идентифицирован ряд полных синтетических агонистов этого рецептора. В 2012 году Amgen объявила об открытии первого представителя класса полных агонистов FFAR1 – AM-1638, обладающего более выраженным эффектом по сравнению со своим предшественником AMG-837 (Mach M. et al., 2021). В последствии на основе AM-1638 были разработаны полные агонисты FFAR1: AM-8182, AM-5262, AM-4668, AM-8596 и др. (Governa P. et al., 2021; Mach M. et al., 2021; Teng D. et al., 2022).

Помимо антидиабетического действия в доклинических исследованиях было обнаружено, что полные агонисты FFAR1 обладают терапевтическим действием в отношении НАЖБП (Ookawara M. et al., 2020). Матричная РНК FFAR1 была обнаружена в гепатоцитах и в клеточной линии HepG2, хотя доказательства экспрессии эндогенного печеночного белка отсутствуют (Kurtz R. et al., 2021). Точную роль FFAR1 в регуляции функции печени еще предстоит выяснить (Kimura T. et al., 2020), однако недавние исследования показали, что FFAR1 выполняет защитную функцию в печени: снижает уровень свободных жирных кислот и ТГ в печени, уменьшает окислительный стресс, фиброз и воспаление (Kimura T. et al., 2020; Kurtz R. et al., 2021). Подобное действие было обнаружено у полного агониста

FFAR1 – SCO-267. При введении *per os* этого соединения мышам с НАЖБП было отмечено уменьшение массы печени, выработки ТГ и коллагена, снижение уровня АЛТ в крови, при отсутствии влияния на потребление пищи или уровень глюкозы (Ookawara M. et al., 2020). Исследование другого агониста FFAR1 – PBI-4050 на мышах, у которых развивался фиброз печени под воздействием CCl₄, показало значительный антифибротический эффект этого соединения (Gagnon L. et al., 2018). Несмотря на то, что большинство исследований сфокусированы на способности агонистов FFAR1 стимулировать секрецию инсулина, существуют исследования, изучающие непосредственное воздействие этих агонистов на гепатоциты. Например, было обнаружено, DHA, эндогенный агонист FFAR1 (и других рецепторов, связанных с G-белком), опосредует свой антилипогенный эффект именно через FFAR1 в гепатоцитах (On S. et al., 2019). Выявлено повышение экспрессии этих рецепторов в гепатоцитах мышей при действии DHA, и показана их ключевая роль в ингибировании накопления липидов в клетках печени посредством снижения экспрессии липогенных ферментов. У полных агонистов FFAR1 – RLA8 и GW9508 также было обнаружено гепатопротекторное действие, механизм действия которых связан со стимуляцией сигнального пути AMPK (Li M. et al., 2016; Li M. H. et al., 2019). Таким образом агонисты FFAR1 могут обладать гепатопротекторным эффектом действуя непосредственно на гепатоциты, либо опосредованно через глюкозозависимый инсулиотропный путь. Учитывая вышесказанное, можно сделать вывод о том, что FFAR1 является многообещающей терапевтической мишенью для лечения СД2 и его осложнений.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Экспериментальные животные

В эксперименте использовали 280 аутбредных самцов мышей CD1 и 40 самцов мышей линии C57Bl/6J массой 25–30 г., а также 20 самцов мышей линии C57Bl/6J A^{y/a} массой 45-50 г. Животные были получены из вивария ФИЦ Института цитологии и генетики СО РАН и содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и стандартному гранулированному корму. Аутбредных мышей CD1 использовали для проведения скрининга, изучения дозозависимого гипогликемического эффекта соединений лидеров, определения концентрации GIP и инсулина, а также для изучения гепатопротекторного действия QS-528. Изучение противодиабетического действия соединений-лидеров проводили на мышах линии C57Bl/6J и C57Bl/6J A^{y/a}. Работы с животными были проведены в строгом соответствии с межгосударственным стандартом ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» от 1 августа 2015 г. и решением Совета Евразийской Экономической Комиссии «Об утверждении правил надлежащей практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» от 3 ноября 2016 года №81, а также одобрены этическим комитетом по биоэтике Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН (протокол № P-12-122019-14, P-01-04-2022-14).

2.2 Исследуемые соединения

В работе использовали хлорид (1R,2R,4R)-N-(4-((4-(2-карбоксиэтил)фенокси)метил)бензил)-1,7,7-триметилбицикло [2.2.1] гептан-2-аммония под шифром QS-528 (рисунок 4) и его новые структурные аналоги (таблица 1), которые были синтезированы в Лаборатории физиологически активных веществ НИОХ СО РАН (зав. лаб., член-корр. Салахутдинов Н.Ф.). Для проведения скрининга гипогликемической активности все структурные аналоги соединения QS-528 вводили *per os* однократно в дозе 10 мг/кг. Изучение

дозозависимого гипогликемического эффекта соединений лидеров проводили в дозах 5, 10, 30 мг/кг. Использованные дозы QS-528 и соединения-лидера – (3-(4-(4-(((1S,2R,4S)-1,7,7-триметилбицикло [2.2.1] гептан-2-илокси) метил) бензилокси) фенил) пропановая кислота) под шифром QS-619 (таблица 1), в проведенных экспериментах представлены в таблице 2. В качестве контрольных соединений использовали гипогликемические средства – вилдаглиптин (Галвус, Новартис, Россия) в дозах 5, 10, 30 мг/кг, метформин (CAS 1115-70-4 Acros Organics, Бельгия) в дозе 250 мг/кг и природную композицию биологически активных веществ, содержащуюся в плодах расторопши пятнистой и обладающих гепатопротекторным действием, силимарин (Легалон 70, MADAUS GmbH, Германия) в дозе 100 мг/кг. Все вещества растворяли в дистиллированной воде (изучаемые вещества предварительно перемешивали с 2-мя каплями Tween 80) и вводили животным *per os*.

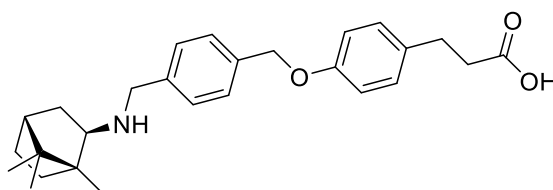


Рисунок 4 – Структурная формула QS-528

Таблица 1 – Новые структурные аналоги соединения QS-528

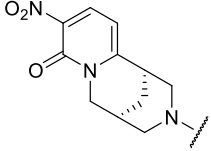
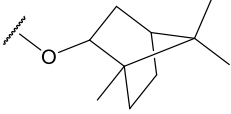
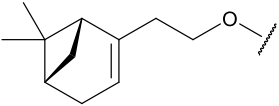
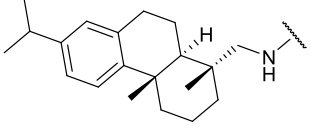
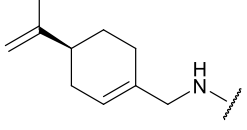
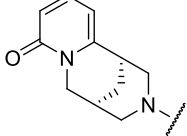
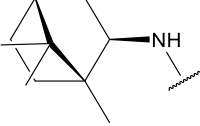
Соединение	R
QS-577	 нитрицитизинил
QS-619	 О-эндоборнил
QS-620	 НОПИЛ
QS-567	 дегидроабиетил
QS-634	 параментил
QS-599	 ЦИТИЗИНИЛ
QS-621	 N-экзоборнил

Таблица 2 – Используемые дозы исследуемых соединений

Исследуемые соединения	Генетическая модель СД2	Диет-индуцированная модель СД2	ССL ₄ -индуцированная модель гепатотоксичности	Определение острой токсичности
QS-528	30 мг/кг	30 мг/кг	60, 90, 120, 150 мг/кг	1000 мг/кг
QS-619	30 мг/кг	30 мг/кг	-	1000 мг/кг
МФ	-	250 мг/кг	-	-
ВИЛ	30 мг/кг	-	-	-
СМ	-	-	100 мг/кг	-

Примечание: МФ: метформин; ВИЛ: вилдаглиптин; СМ: силимарин.

2.3 Фармакологические модели и тесты

2.3.1 Оральный глюкозотолерантный тест

Оральный глюкозотолерантный тест (ОГТТ) использовали для оценки гипогликемического действия исследуемых соединений при проведении скрининга, изучения дозозависимого эффекта и изучения противодиабетического действия на диет-индуцированной и генетически обусловленной модели СД2.

Всем животным в опытных группах натощак (голод 12 ч) перорально вводили тестируемые соединения, а животным контрольной группы только носитель (дистиллированная вода с 2-мя каплями Tween 80), и далее через 30 мин проводили пероральную нагрузку глюкозой (2,5 г/кг). Концентрацию глюкозы в крови измеряли с помощью глюкометра ONE TOUCH Select (LIFESCAN Inc., США) перед введением глюкозы (0 мин), и далее через 30, 60, 90, 120 мин после введения глюкозы. Вилдаглиптин (5, 10, 30 мг/кг) и метформин (250 мг/кг) использовали в качестве положительного контроля.

Площадь под гликемической кривой (AUC) была подсчитана с использованием математической модели Tai (Tai М.М., 1994) по формуле:

$$\text{Area} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n x_{i-1} (y_{i-1} + y_i)$$

где n-количество исследуемых групп, x_i – время исследования (мин), y_i – концентрация глюкозы крови (ммоль/л).

2.3.2 Скрининг гипогликемической активности

Для проведения скрининга использовали аутбредных самцов мышей CDI, которых рандомизировали и делили на 6 групп (n=5 в каждой группе). Соединения QS-528 и его структурные аналоги вводили *per os* однократно дозе 10 мг/кг, после чего проводили ОГТТ с целью обнаружения соединения-лидера.

Изучение дозозависимого гипогликемического эффекта соединения QS-528 и соединения-лидера проводили в дозах 5, 10, 30 мг/кг после однократного *per os* введения самцам мышей CDI, разделяя их предварительно на 4 группы (n=5 в каждой группе). Далее проводили ОГТТ, чтобы выявить дозу, при которой развивается максимальный эффект исследуемых соединений.

В качестве положительного контроля в обоих экспериментах использовали вилдаглиптин в дозах 5, 10, 30 мг/кг.

2.3.3 Генетически обусловленная модель сахарного диабета 2 типа

В течение месяца самцов мышей линии C57Bl/6J A^y/_a (Derkach K.V. et al., 2017; Klebig M.L. et al., 1995) (возраст 3 месяца) содержали на диете, состоящей из стандартного гранулированного корма, к которому было добавлено печенье и свиное сало в качестве дополнительного источника жиров и углеводов для ускорения развития ожирения и нарушения толерантности к глюкозе. По достижению животными массы ≥ 35 г и повышения уровня глюкозы натощак их разделили на 4 группы (n=5 в каждой группе) (таблица 3). В качестве интактного контроля в эксперименте использовали самцов мышей линии C57Bl/6J (n=5 в

каждой группе). С целью определения толерантности к глюкозе и влияния соединений лидеров на концентрацию глюкозы в крови проводили ОГТТ. Первоначально ОГТТ был проведен после однократного *per os* введения QS-528 и QS-619 в дозе 30 мг/кг, повторно – по истечении 2-х недель, в течение которых мышам ежедневно вводили исследуемые соединения (таблица 3). Диету не изменяли. По окончании эксперимента мышей декапитировали и собрали кровь для проведения биохимического исследования. Печень забрали для гистологического и морфометрического исследования.

Таблица 3 – Исследуемые соединения на генетической модели СД2

Название группы	Исследуемое соединение
Группа №1 «Интактный контроль»	H ₂ O _{дистил.} + 2 капли Tween 80
Группа №2 «Отрицательный контроль»	H ₂ O _{дистил.} + 2 капли Tween 80
Группа №3 «Положительный контроль»	Вилдаглиптин, 30 мг/кг
Группа №4	QS-528, 30 мг/кг
Группа №5	QS-619, 30 мг/кг

Примечание: Группа №1 – самцы мышей линии C57Bl/6J; группа №2-5 – самцы мышей линии C57Bl/6J A^{y/a}.

2.3.4 Диет-индуцированная модель сахарного диабета 2 типа

Самцов мышей линии C57Bl/6J в течение 7 месяцев содержали на диете с высоким содержанием жиров (36%) и углеводов (37%) (Petro A.E. et al., 2004; Surwit R. S. et al., 1988). Концентрацию глюкозы в крови контролировали еженедельно с помощью глюкометра ONE TOUCH Select (LIFESCAN Inc., США). По достижению животными нарушенной толерантности к глюкозе в ОГТТ они были разделены на 5 групп (n=6-8 в каждой группе) (таблица 4). Далее в течение 4 недель животным ежедневно *per os* вводили тестируемые соединения, диету не изменяли. ОГТТ проводили на 14 и 28 день эксперимента. По окончании эксперимента (30 день) мышей декапитировали. Кровь была забрана для проведения биохимического анализа, а печень для гистологического исследования.

Таблица 4 – Исследуемые соединения на диет-индуцированной модели СД2

Название группы	Исследуемое соединение
Группа №1 «Интактный контроль»	H ₂ O _{дистил.} + 2 капли Tween 80
Группа №2 «Отрицательный контроль»	H ₂ O _{дистил.} + 2 капли Tween 80
Группа №3 «Положительный контроль»	Метформин, 250 мг/кг
Группа №4	QS-528, 30 мг/кг
Группа №5	QS-619, 30 мг/кг

Примечание: группа №1 – самцы мышей линии C57Bl/6J; группа №2-5 – самцы мышей линии C57Bl/6J, которых содержали на высококалорийной диете.

2.3.5 Тетрахлорметан – индуцированная модель гепатотоксичности

Для изучения гепатопротекторного действия соединения QS-528 использовали модифицированную модель CCl₄ – индуцированной гепатотоксичности (Kojima-Yuasa A. et al., 2016). QS-528 вводили *per os* аутбредным самцам мышей CDI (n=9 в каждой группе) в дозах 60, 90, 120, 150 мг/кг в течение 3-х недель ежедневно (таблица 5).

Дозы соединения QS-528 были подобраны в соответствии с предварительными экспериментами на той же модели гепатотоксичности, где его исследовали в дозах 30 и 60 мг/кг. Слабо выраженный гепатопротекторный эффект наблюдался в дозе 60 мг/кг. В соответствии с этим для данного эксперимента выбраны большие дозы с интервалом 30 мг/кг.

Раствор CCl₄ вводили всем исследуемым группам, за исключением группы интактного контроля, *per os* 2 раза в неделю через час после введения исследуемых соединений. Параллельно с этим вместо воды мыши групп №2-7 получали 5%-й раствор этилового спирта из поилок в режиме свободного доступа в течение 3-х недель. По окончании эксперимента (22 день) мышей декапитировали и собрали кровь для проведения биохимического исследования, а печень забрали для проведения гистологического и морфометрического исследования.

Таблица 5 – Исследуемые соединения на CCl_4 – индуцированной модели гепатотоксичности

Название группы	Исследуемое соединение
Группа №1 «Интактный контроль»	$\text{H}_2\text{O}_{\text{дистил}}$ + 2 капли Tween 80
Группа №2 «Отрицательный контроль»	$\text{H}_2\text{O}_{\text{дистил}}$ + 2 капли Tween 80
Группа №3 «Положительный контроль»	Силимарин, 100 мг/кг
Группа №4	QS-528, 60 мг/кг
Группа №5	QS-528, 90 мг/кг
Группа №6	QS-528, 120 мг/кг
Группа №7	QS-528, 150 мг/кг

Примечание: группам № 2-7 вводили 0,5 % раствор CCl_4 в растительном масле. Вместо воды мыши этих групп получали 5%-й раствор этилового спирта.

2.3.6 Биохимическое исследование крови

После коагуляции (30 мин) образцы крови центрифугировали при 1640 g в течение 15 мин для получения сыворотки. С помощью стандартных диагностических наборов (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия) и спектрофотометра Stat Fax 3300 (Awareness Technology Inc., США) определяли уровень глюкозы, ОХ, ТГ, ЛПНП, ЛПВП, общий белок, АЛТ, аспартатаминотрансферазу (АСТ), щелочную фосфатазу (ЩФ).

2.3.7 Гистологическое исследование печени

Печень фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 4 суток. Затем из органов вырезали образцы толщиной 5-7 мм и проводили стандартную дегидратацию в восходящей концентрации этанола и ксилола на аппарате НМР 110 гистологического комплекса MICROM («Carel Zeiss», Германия по схеме (Лилли Р.Д., 1969)). Образцы ткани заливали в парафиновые блоки на рабочей станции AP 280 с использованием Histoplast (Thermo Fisher Scientific, США) с температурой плавления 58°C. Срезы тканей толщиной 4,5 μM готовили на ротационном микротоме NM 335E с одноразовыми сменными лезвиями. Срезы

окрашивали гематоксилином и эозином по методу Маллори, ШИК-гематоксилин-оранжевым G и исследовали под световым микроскопом при увеличении $\times 100$ –200.

2.3.8 Морфометрическое исследование печени

Анализ срезов печени проведен при увеличении микроскопа $\times 400$ с использованием окулярной сетки на 289 точек (Авантадилов Г.Г., 1990). Подсчет проводили в 35 полях зрения каждого препарата, от 6 животных в группе, 5 фотографий на одно животное.

Определение объемной плотности ядер и цитоплазмы гепатоцитов, синусоидов, жировой дистрофии и некрозов печени проводили методом подсчета числа попаданий точек (концов тестовых линий) на профили исследуемых структур в гистологическом срезе. Объемную плотность каждого структурного компонента печени определяли по его доле с применением формулы: $x:n$, где x – количество точек, приходящихся на данный компонент, n – общее количество подсчитанных точек (Авантадилов Г.Г., 1990). Данные представлены в условных единицах (у.ед.).

2.3.9 Определение концентрации инсулина в крови мышей

В эксперименте использовали аутбредных самцов мышей CDI, которые были разделены на 4 группы ($n=5$ в каждой группе). Животным натощак (голод 12 ч) вводили соединения QS-528 и QS-619 *per os* в дозе 30 мг/кг. В качестве положительного контроля использовали вилдаглиптин *per os* в дозе 10 мг/кг. Все исследуемые соединения, включая положительный контроль, предварительно смешивали с двумя каплями Tween 80 и растворяли в дистиллированной воде. Животным контрольной группы вводили только дистиллированную воду с 2-мя каплями Tween 80. Через 30 мин после введения соединений проводили пероральную нагрузку глюкозой (2,5 г/кг). Кровь объемом 0,1 мл собирали из хвоста животных перед введением соединений и далее через 15, 30, 60 мин после введения глюкозы. После коагуляции (не менее 30 мин) образцы крови центрифугировали 15 мин при 1640g для отделения сыворотки. Образцы

сыворотки замораживали для дальнейшей оценки инсулина. Для определения концентрации инсулина в сыворотке крови мышей использовали стандартный набор для ИФА (кат. № EZRMI-13K, Millipore, Merck KGaA, Германия). Подготовка образцов и все процедуры проводились в соответствии с руководством производителя. Для анализа использовали фотометр Multiscan Ascent (Thermo Labsystems, Финляндия).

2.3.10 Определение концентрации GIP в крови мышей

Для проведения эксперимента использовали аутбредных самцов мышей CDI, которые были разделены на 4 группы (n=7 в каждой группе). Соединения QS-528 и QS-619 вводили *per os* в дозе 30 мг/кг. В качестве положительного контроля использовали вилдаглиптин *per os* в дозе 10 мг/кг. Все исследуемые соединения, включая положительный контроль, предварительно смешивали с двумя каплями Tween 80, растворяли в дистиллированной воде и вводили натошак (голод 12 ч.). Животным контрольной группы вводили только дистиллированную воду с 2-мя каплями Tween 80. Через 30 мин после введения соединений проводили пероральную нагрузку глюкозой (2,5 г/кг). Далее кровь объемом 0,1 мл собирали из хвоста животного перед введением соединений и далее через 5 и 10 мин после введения глюкозы. После коагуляции (не менее 30 мин) образцы крови центрифугировали 15 мин при 1640g для отделения сыворотки. Образцы сыворотки замораживали для дальнейшей оценки GIP. Для определения концентрации GIP в сыворотке крови использовали стандартный набор ИФА (кат. №81527, Crystal Chem, США). Подготовка образцов и все процедуры проводились в соответствии с руководством производителя. Для анализа использовали фотометр Multiscan Ascent (Thermo Labsystems, Финляндия).

2.4 Исследования *in vitro*

2.4.1 Определение активности соединений по отношению к FFAR1

Для исследования соединений QS-528 и QS-619 *in vitro* использовали стандартный набор FFAR1 (GPR40) Reporter Assay Kit (кат. №601190, Cayman Chemical, США). Подготовка образцов и все процедуры проводились в соответствии с руководством производителя. В качестве положительного контроля использовали известный агонист FFAR1 – GW9508 (в составе набора). Для анализа использовали флуориметр (CLARIOstar Plus, BMG LABTECH, Германия). Способность соединений QS-528 и QS-619 активировать FFAR1 представлена в процентах и оценивалась относительно максимальной эффективности GW9508.

2.4.2 Изучение способности соединений ингибировать фермент DPP-4

Для определения ингибирующей активности соединений QS-528 и QS-619 в отношении фермента DPP-4 использовали набор для флуорометрического анализа (DPP (IV) Inhibitor Screening Assay Kit, Cayman Chemical, США). В качестве ингибитора положительного контроля использовали ситаглиптин (в составе набора). Вещества разводили в диметилсульфоксиде (ДМСО (Реагентный компонент, Россия)) и тестировали в конечной концентрации 100 μM в 10% ДМСО). Анализ был основан на высвобождении АМС (7-амино-4-метил-кумарин) из субстрата DPP-4, Gly-Pro-АМС. Изменения флуоресценции в результате расщепления молекулы DPP-4 измеряли при длине волны возбуждения и испускания 350 и 450 нм с помощью ClarioStar (BMG Labtech, Германия). Процентное ингибирование активности DPP-4 рассчитывали относительно исходной активности (контрольная группа, без ингибиторов) по формуле: % ингибирования = (исходная активность - активность с ингибитором) / исходная активность * 100.

2.4.3 Изучение соединений на клеточной культуре HepG2

2.4.3.1 Клеточная культура

Клетки HepG2 были получены из центра коллективного пользования «Коллекция культур клеток позвоночных» Института цитологии РАН. Клетки культивировали в среде DMEM с высокой концентрацией глюкозы (Servicbio, Китай), содержащей 10% FBS (Sigma-Aldrich, Бразилия), 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ЕД/мл пенициллина и 0,25 мкг/мл амфотерицина В (Sigma-Aldrich, США) при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ (NuAire, Inc., США). Клетки пассировали, когда слияние клеток превышало 80%, примерно два раза в неделю.

2.4.3.2 Дизайн эксперимента на клеточной культуре HepG2

Клетки высевали в 96-луночные планшеты (TPP, Швейцария) плотностью 3×10^5 клеток/мл в среду DMEM с высокой концентрацией глюкозы, содержащей 10% FBS. После культивирования в течение 24 ч клетки дважды промывали HBSS (Gibco, Великобритания) и среду заменяли на бессывороточную среду DMEM (Servicbio, Китай) с низкой концентрацией глюкозы (5,5 mM глюкозы). Далее добавляли исследуемые соединения – QS-528 и QS-619 (2,5, 5, 10 µM) и положительный контроль – метформин (1, 2,5, 5 mM) (CAS 1115-70-4 Acros Organics, Бельгия) в различных концентрациях, делая повторное добавление в 3-4 лунки. Метформин использовали в высоких дозах, которые были выбраны на основании литературных данных (Ma Z. et al., 2021). Через 24 часа часть супернатанта собирали для оценки способности клеток потреблять глюкозу и высвобождать лактат. Жизнеспособность клеток измеряли с помощью анализа МТТ.

2.4.3.3 Анализ потребления глюкозы и высвобождения лактата

Уровень глюкозы определяли с помощью стандартного набора (Вектор-Бест, Россия) на основе глюкозооксидазного метода с использованием фотометра Multiscan Ascent (Thermo Labsystems, Финляндия). Потребление глюкозы рассчитывали путем вычитания концентрации глюкозы в супернатанте пустой

лунки (DMEM без клеток) из концентрации глюкозы в супернатанте лунки с клетками. Данные представлены в процентах от максимального потребления глюкозы (5,5 mM) и нормализованы по отношению к контролю (обработанному носителем) для каждого планшета. При этом концентрацию лактата в супернатанте также определяли стандартным набором (Вектор-Бест, Россия). Высвобождение лактата представлено в процентах от максимального значения (11 mM) и нормализовано по отношению к контролю.

2.4.3.4 МТТ анализ, оценивающий жизнеспособность клеток

К среде добавляли раствор реагента МТТ (тиазолил синий тетразолия бромид (Panreac AppliChem, Германия)) (5 мг/мл) в объемном соотношении 1:10 и инкубировали 4 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе. Затем удаляли супернатант и растворяли осадок в ДМСО (Reagent Component, Россия) для определения оптической плотности. Жизнеспособность клеток рассчитывали в процентах от значения контрольной группы.

2.5 Определение острой токсичности

Для определения острой токсичности соединения QS-528 и QS-619 вводили *per os* аутбредным самцам мышей CDI (n = 8 в каждой группе) в разовой дозе 1000 мг/кг. В течение следующих 10 дней оценивали внешний вид животных, поведение, массу тела и летальность.

2.6 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета STATISTICA 10.0. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. В случаях нормального распределения признаков для статистической оценки применяли параметрический t-критерий Стьюдента и представляли данные в виде среднего арифметического значения (S) ± ошибки среднего арифметического (m). При отклонениях распределений признака от нормального вида для независимых выборок использовали

непараметрический U-критерий Манна-Уитни, данные представляли в формате: медиана (M) $\pm$ квартильный размах (qr). Различия двух сравниваемых величин считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Скрининг структурных аналогов соединения QS-528

Был проведен скрининг 7 структурных аналогов соединения QS-528 в дозе 10 мг/кг на наличие гипогликемического действия в ОГТТ. По результатам исследования было обнаружено, что только соединение – (3-(4-(4-(((1S,2R,4S)-1,7,7-триметилбицикло [2.2.1] гептан-2-илокси) метил) бензилокси) фенил) пропановая кислота) под шифром QS-619 (таблица 1) достоверно снижало уровень глюкозы в крови животных по сравнению с группой интактного контроля, а также не уступало положительному контролю – вилдаглиптину и своему структурному аналогу – QS-528 по гипогликемическому действию (таблица 6, рисунок 5).

Таблица 6 – Результаты скрининга в ОГТТ структурных аналогов соединения QS-528 ($M \pm qr$) ($n=5$ в каждой группе)

Исследуемые соединения	Концентрация глюкозы, ммоль/л				
	Время после введения глюкозы, мин				
	0	30	60	90	120
Интактный контроль	3,65±1,00	13,25±3,10	12,55±2,00	8,05±1,10	6,45±1,00
ВИЛ, 10 мг/кг	3,65±0,70	11,90±1,60*	10,00±0,90*	6,95±1,10*	5,15±0,80*
QS-528, 10 мг/кг	3,05±0,70	12,40±0,50*	12,40±5,00	6,90±1,40*	5,40±1,00*
QS-634, 10 мг/кг	3,75±0,20	13,70±2,70	11,15±3,00	8,20±0,30	6,25±0,30
QS-619, 10 мг/кг	3,70±0,80	15,40±2,60	10,70±3,60*	7,90±3,00	5,40±2,20*
QS-577, 10 мг/кг	3,20±0,55	15,00±2,35	12,20±2,90	7,00±0,95	6,10±1,65
QS-599, 10 мг/кг	2,70±0,60	14,90±1,40	13,80±3,60	8,70±2,60	6,70±1,20
QS-567, 10 мг/кг	3,30±0,50	13,95±1,65	12,10±2,15	11,25±1,90	5,80±0,90
QS-621, 10 мг/кг	3,60±0,20	15,70±2,00	13,65±1,25	9,60±1,30*	6,60±1,00
QS-620, 10 мг/кг	3,50±1,10	13,10±3,20	13,70±7,20	9,10±1,30	6,00±0,60

Примечание: * $p \leq 0,05$ по сравнению с группой интактного контроля. ВИЛ: вилдаглиптин.

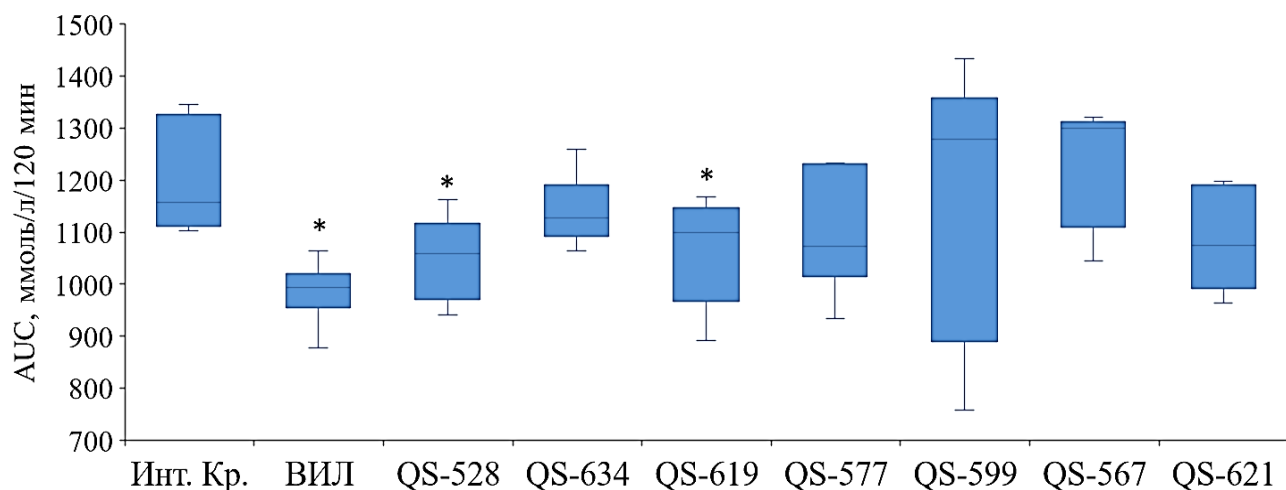


Рисунок 5 – Площадь под гликемической кривой (AUC), рассчитанная по результатам скрининга структурных аналогов QS-528 в дозе 10 мг/кг в ОГТТ ($M \pm qr$) ($n=5$ в каждой группе). ВИЛ в дозе 10 мг/г

Примечание: * $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой. Инт. Кр.: интактный контроль; ВИЛ: вилдаглиптин.

3.2 Изучение дозозависимого гипогликемического действия соединений QS-528 и QS-619

Для изучения изменения гипогликемического эффекта соединений QS-619 и QS-528 в зависимости от дозы были проведены исследования в ОГТТ с использованием трех разных доз: 5, 10, 30 мг/кг. Из таблицы 7 видно, что минимальной дозой, при которой появлялась гипогликемическая активность соединений QS-619 и QS-528 является 10 мг/кг. Это также подтверждается значениями площади под гликемической кривой исследуемых соединений (рисунок 6). При снижении дозы до 5 мг/кг гипогликемический эффект как соединений QS-619, QS-528, так и вилдаглиптина пропадал (рисунок 6). Это свидетельствует о том, что минимальной эффективной дозой вилдаглиптина также является 10 мг/кг. Отсутствие гипогликемического эффекта, вероятно, связано с тем, что дозы 5 мг/кг недостаточно для стимуляции секреции инсулина, и как следствие, снижения глюкозы в крови. При увеличении дозы до 30 мг/кг соединения QS-528 и QS-619 снижали уровень глюкозы не только по сравнению с животными группы интактного контроля, но и с мышами группы положительного контроля (рисунок 6). Поскольку лучший гипогликемический эффект наблюдался

в дозе 30 мг/кг, эта доза была выбрана для дальнейшего исследования соединений QS-619, QS-528 на генетически-обусловленной и диет-индуцированной модели СД2.

Таблица 7 – Результаты изучения дозозависимого гипогликемического эффекта соединений QS-528 и QS-619 ($M \pm qr$) ($n=5$ в каждой группе)

Исследуемые соединения	Концентрация глюкозы, ммоль/л				
	Время после введения глюкозы, мин				
	0	30	60	90	120
5 мг/кг					
Интактный контроль	2,70±0,6	11,70±5,2	7,90±3,3	5,40±1,9	4,10±1,5
ВИЛ	2,60±0,7	10,00±3,1	7,70±1,8	4,70±0,4	3,50±0,7
QS-528	2,40±0,3	13,05±3,1	10,30±1,2	6,20±2,3	3,95±0,6
QS-619	2,30±0,8	13,00±1,8	9,10±3,3	6,75±1,3	4,35±1,6
10 мг/кг					
Интактный контроль	3,65±1,0	13,25±3,1	12,55±2,0	8,50±0,9	6,45±1,0
ВИЛ	3,65±0,7	11,90±1,6*	10,20±0,9*	6,95±1,1*	5,15±0,8*
QS-528	3,00±0,7	12,80±0,8	12,40±5,0	6,90±1,4*	5,40±0,8*
QS-619	3,70±0,8	15,40±2,6	10,70±3,6*	7,90±3,0	5,30±1,0*
30 мг/кг					
Интактный контроль	3,30±0,6	14,40±1,7	13,10±2,8	8,80±1,9	6,90±1,2
ВИЛ	3,10±0,5	14,90±2,4	11,50±4,2*	7,70±1,0*	6,30±0,8*
QS-528	3,20±0,6	11,50±1,7*	10,90±3,1*	7,20±1,8*	5,60±1,6*
QS-619	3,20±0,9	11,50±5,0*	10,30±1,5*	7,40±1,1*	5,40±0,5*

Примечание: * $p \leq 0,05$ по сравнению с группой интактного контроля. ВИЛ: вилдаглиптин.

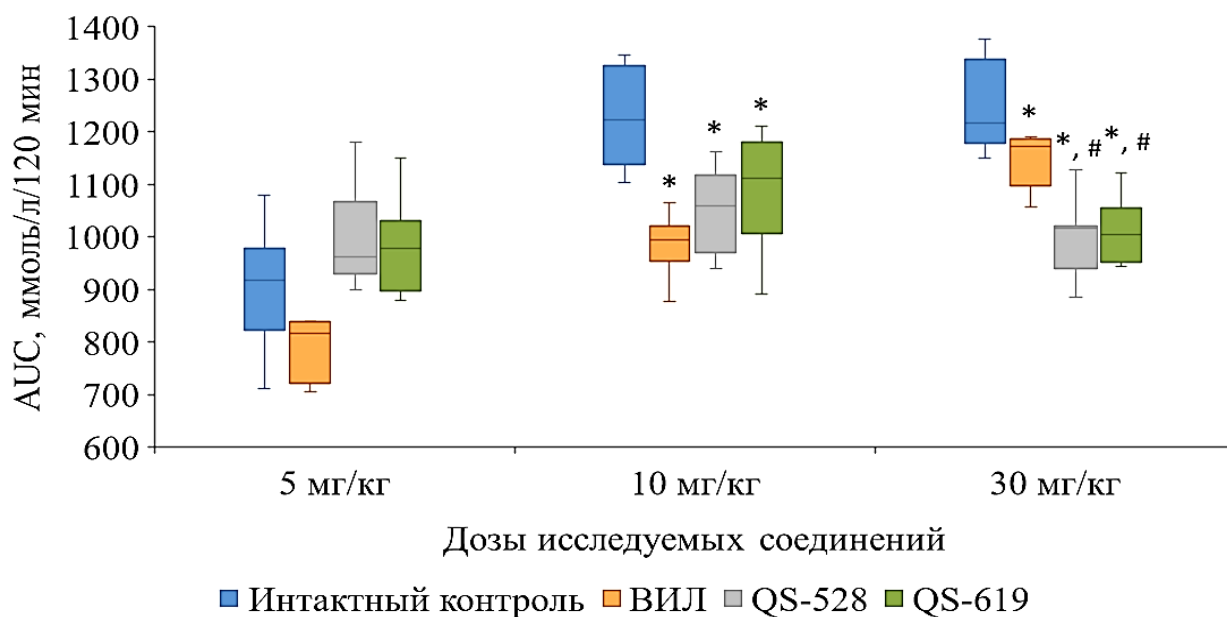


Рисунок 6 – Площадь под гликемической кривой (AUC), рассчитанная по результатам изучения дозозависимого гипогликемического эффекта QS-528 и QS-619 в ОГТТ ($M \pm qr$) ($n=5$ в каждой группе)

Примечание: * $p \leq 0,05$ по сравнению с группой интактного контроля; # $p \leq 0,05$ по сравнению с вилдаглиптином 30 мг/кг. ВИЛ: вилдаглиптин.

Снижение гипогликемического действия вилдаглиптина при увеличении дозы до 30 мг/кг (рисунок 6), вероятно, связано с предотвращением распада GIP. Из литературных данных известно, что вилдаглиптин является ингибитором фермента DPP-4 (Stein S. A. et al., 2014). Ингибируя данный фермент, он препятствует распаду GLP-1, который связывается с соответствующим рецептором на β -клетках ПЖ, и в конечном итоге, способствует секреции инсулина (Sebastiani G. et al., 2018). Однако, помимо GLP-1, существуют другие метаболически важные пептиды, которые подвержены расщеплению DPP-4, в частности, GIP, концентрация которого увеличивается при ингибировании DPP-4 (Raab S. et al., 2016). GIP стимулирует как секрецию инсулина, так и секрецию глюкагона, который увеличивает продукцию глюкозы печенью. При ингибировании DPP-4 может также снижаться чувствительность β -клеток ПЖ к GIP и, как результат, снижаться секреция инсулина, что наряду с действием глюкагона приводит к повышению уровня глюкозы в крови (Lambeir A.M. et al., 2003). Кроме этого, снижение эффекта вилдаглиптина в данном случае также может быть вызвано

более выраженным ингибированием фермента DPP-4 не только в плазме крови, но и, например, в стенках эндотелия сосудов ПЖ, поскольку считается, что растворенный в крови DPP-4, возможно, происходит из эндотелиальных или эпителиальных клеток и из циркулирующих лейкоцитов (Burkey B.F. et al., 2005; Lambeir A.M. et al., 2003).

3.3 Изучение противодиабетического действия соединений QS-528 и QS-619 на генетически обусловленной модели сахарного диабета 2 типа

После определения дозозависимого гипогликемического действия, мы исследовали соединения QS-528 и QS-619 в дозе 30 мг/кг на генетически обусловленной модели СД2, а именно на мышах линии C57Bl/6J A^{y/a} (Derkach K.V. et al., 2017; Klebig M.L. et al., 1995). Это трансгенные мыши, имеющие желтый окрас шерсти, у которых развивается ожирение, инсулинорезистентность, гиперинсулинемия и гипергликемия. Метаболические нарушения, наблюдаемые у мышей C57Bl/6J A^{y/a} вызваны доминантной мутацией Agouti yellow в локусе агути (хромосоме 2), приводящей к эктопической экспрессии белка агути, который в норме временно экспрессируется в фолликулярных меланоцитах и стимулирует выработку красного/желтого пигмента (феомеланина) и ингибирует выработку черного/коричневого пигмента (эумеланина) (Carroll L. et al, 2004; Voisey J., van Daal A., 2002). Развитие ожирения у этих мышей обусловлено резким повышением аппетита (гиперфагией) вследствие блокады белком агути меланокортинового рецептора 4 типа (MC4R), экспрессируемого в головном мозге, и потери анорексигенного влияния α -меланоцитстимулирующего гормона – гормона насыщения (Baldini G., Phelan K.D., 2019). Таким образом, они являются подходящей моделью СД2, которая активно используется для изучения новых противодиабетических средств.

3.3.1 Оральный глюкозотолерантный тест на мышах линии C57Bl/6J A^{y/a}

Перед началом длительного введения исследуемых соединений необходимо было подтвердить нарушенную толерантность к глюкозе у мышей линии C57Bl/6J A^{y/a}, а также оценить гипогликемическое действие соединений QS-528 и QS-619 после однократного введения. Для этого был выполнен ОГТТ, по результату которого у мышей в группе отрицательного контроля было обнаружено достоверное повышение уровня глюкозы в крови через 90 и 120 мин после введения глюкозы по сравнению с мышами интактного контроля, что подтверждает корректность выбранной модели СД2 (рисунок 7). При этом гликемический профиль соединения QS-619 практически совпал с группой отрицательного контроля, тогда как соединение QS-528, наоборот, показало гипергликемический эффект, достоверно увеличив концентрацию глюкозы в крови у экспериментальных животных (рисунок 7). В данном эксперименте только при введении вилдаглиптина было обнаружено статистически значимое снижение глюкозы (рисунок 7).

Далее этим животным в течение 2-х недель продолжили введение исследуемых веществ в дозе 30 мг/кг. После чего ОГТТ был проведен повторно, по результату которого нарушенная толерантность к глюкозе осталась неизменной в группе контрольных мышей C57Bl/6J A^{y/a} (рисунок 8). При этом был обнаружен гипогликемический эффект QS-619, что видно как по сниженной гликемической кривой (рисунок 8), так и площади под гликемической кривой (AUC) (рисунок 9). Гипергликемическое действие QS-528 снизилось, однако общий уровень глюкозы у животных не отличался от таковой в контрольной группе C57Bl/6J A^{y/a} (рисунок 8 и 9).

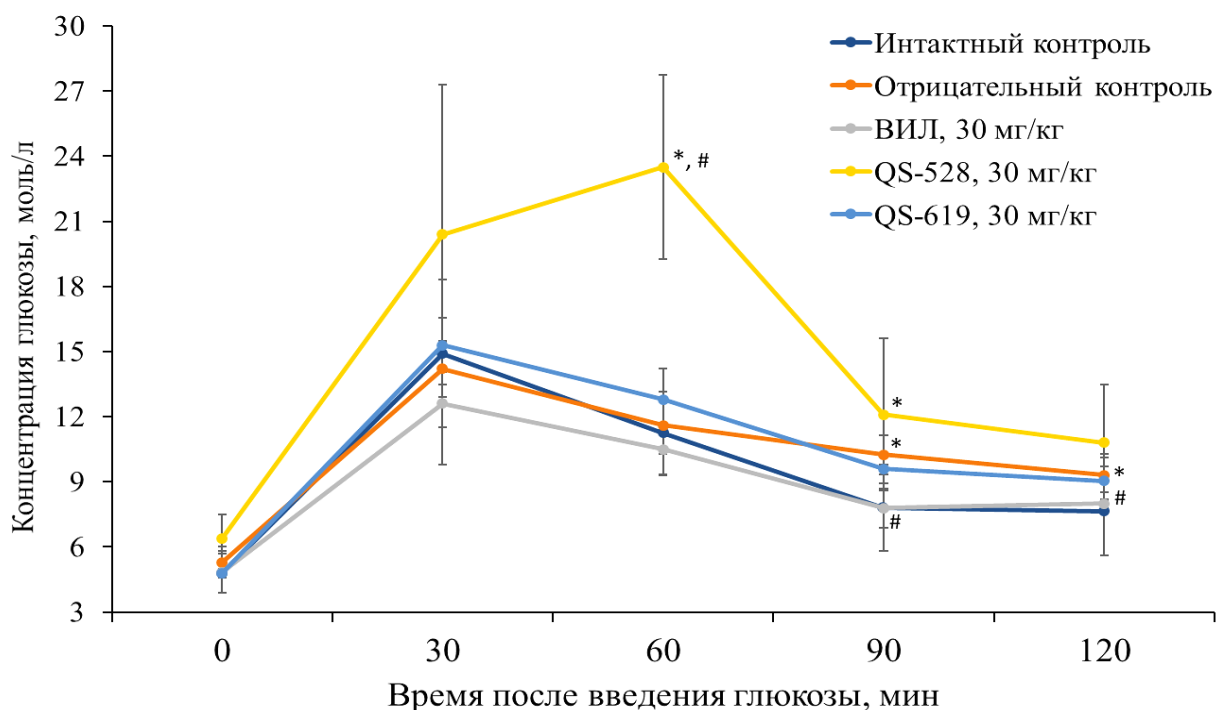


Рисунок 7 – Результаты ОГТТ после однократного введения соединений QS-528 и QS-619 мышам линии C57Bl/6J A^{y/a} (M±qr) (n=5 в каждой группе)
Примечание: * $p \leq 0,05$ по сравнению с группой интактного контроля; # $p \leq 0,05$ по сравнению с группой отрицательного контроля. ВИЛ: вилдаглиптин.

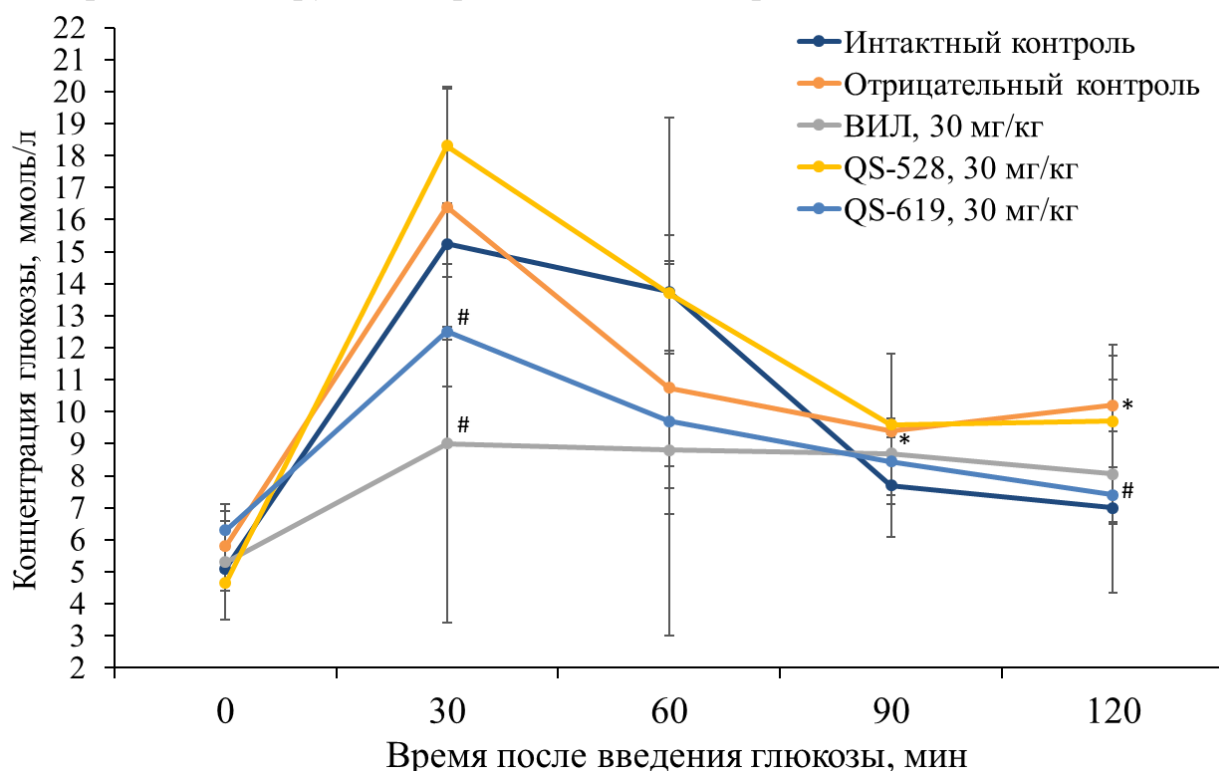


Рисунок 8 – Результаты ОГТТ после 2-х недельного введения соединений QS-528 и QS-619 мышам линии C57Bl/6J A^{y/a} (M±qr) (n=5 в каждой группе)
Примечание: * $p \leq 0,05$ по сравнению с группой интактного контроля; # $p \leq 0,05$ по сравнению с группой отрицательного контроля. ВИЛ: вилдаглиптин.

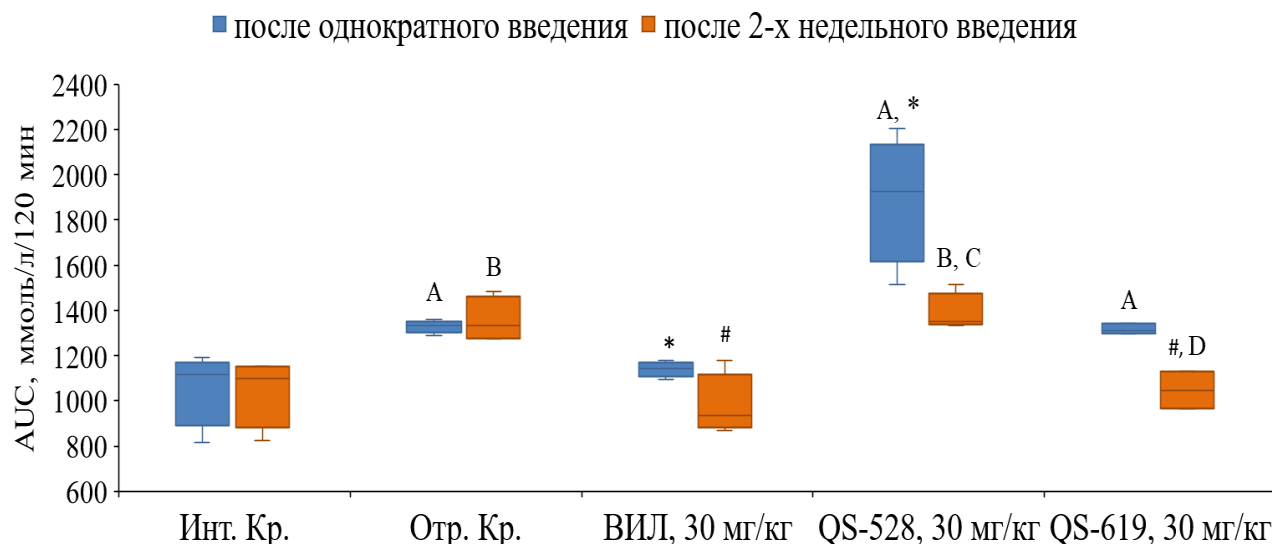


Рисунок 9 – Площадь под гликемической кривой (AUC), рассчитанная по результатам ОГТТ, проведенного после однократного и 2-х недельного введения соединений QS-528 и QS-619 мышам линии C57Bl/6J A^{y/a} (M±qr) (n=5 в каждой группе)

Примечание: * $p \leq 0,05$ по сравнению с отрицательным контролем после однократного введения; # $p \leq 0,05$ по сравнению с отрицательным контролем после 2-х недельного введения; ^A $p \leq 0,05$ по сравнению с интактным контролем после однократного введения; ^B $p \leq 0,05$ по сравнению с интактным контролем после 2-х недельного введения; ^C $p \leq 0,05$ по сравнению с QS-528 после однократного введения; ^D $p < 0,05$ по сравнению с QS-619 после 1-го введения. Инт. Кр.: интактный контроль; Отр. Кр.: отрицательный контроль; ВИЛ: вилдаглиптин.

3.3.2 Биохимическое исследование крови

По результату биохимического исследования крови было обнаружено, что соединение QS-528 снижало ОХ и ЛПВП в крови животных, кроме этого, происходило достоверное снижение глюкозы (это коррелирует с исходным уровнем глюкозы при ОГТТ после 14 дней введения веществ) (таблица 8). Соединение QS-619 не проявило схожего действия. Биохимические параметры крови животных в группе вилдаглиптина в целом были аналогичны мышам C57Bl/6J A^{y/a} из группы отрицательного контроля.

Таблица 8 – Результаты биохимического анализа крови мышей после 2-х недель введения QS-528 и QS-619 в дозе 30 мг/кг ($M \pm qr$) ($n=5$ в каждой группе)

	ОХ, моль/л	ТГ, моль/л	ЛПВП, мг/дл	ЛПНП, мг/дл	Глюкоза, ммоль/л
Интактный контроль	1,59±0,14	0,54±0,04	82,66±5,29	15,13±2,02	5,55±0,38
Отрицательный контроль	2,59±0,27*	0,64±0,03	99,33±6,38	10,36±1,49	7,15±0,69*
ВИЛ, 30 мг/кг	3,26±0,10*	0,46±0,04	109,67±5,23*	13,13±0,95	8,41±0,43*
QS-528, 30 мг/кг	1,79±0,21 [#]	0,58±0,02	78,30±5,73 [#]	9,38±1,25	5,16±0,52 [#]
QS-619, 30 мг/кг	2,80±0,25*	0,64±0,06	90,48±8,6	10,78±1,38	6,58±1,06

Примечание: * $p \leq 0,05$ по сравнению с интактным контролем; [#] $p \leq 0,05$ по сравнению с отрицательным контролем. ОХ: общий холестерин; ТГ: триглицериды; ЛПВП: липопротеиды высокой плотности; ЛПНП: липопротеиды низкой плотности; ВИЛ: вилдаглиптин.

3.3.3 Гистологическое исследование печени

По окончании эксперимента печень была забрана для гистологического исследования. У контрольных мышей C57Bl/6J архитектоника печени была сохранена, желчные капилляры, вены и артерии имели типичное строение, а признаки патологической инфильтрации, некроза и фиброза отсутствовали (рисунок 10). В синусоидах определялись купферовские клетки без признаков повышенной активности и единичные мононуклеарные лейкоциты.

В печени мышей C57Bl/6J A^y/a в контрольной группе через 14 дней наблюдались типичные признаки поражения в виде выраженной полиморфной липидной инфильтрации гепатоцитов (рисунок 11). У всех животных отмечались признаки повышения регенераторной активности печени, свидетельством которой являлись незначительная гетерогенность ядер и размера гепатоцитов (разный размер гепатоцитов, ядер, внутриядерные включения), и активированные купферовские клетки. Гликоген в гепатоцитах не определялся.

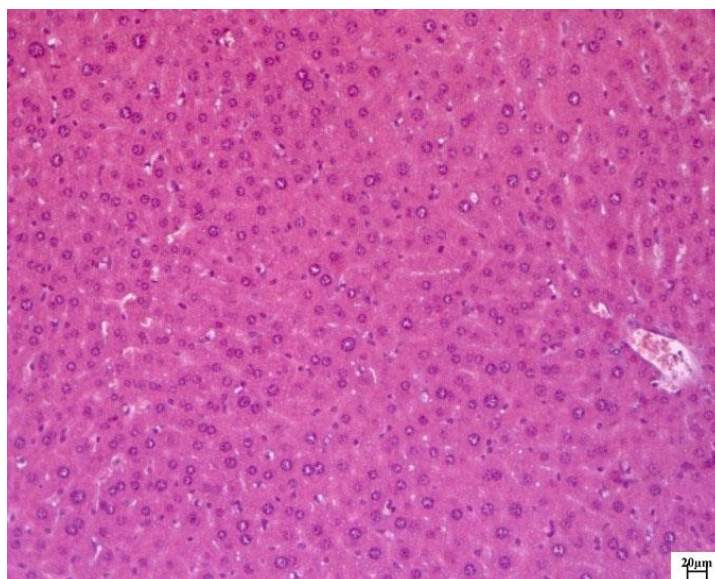


Рисунок 10 – Микрофотография печени мышей группы интактного контроля (C57BL/6J). Ядерный полиморфизм гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 200$

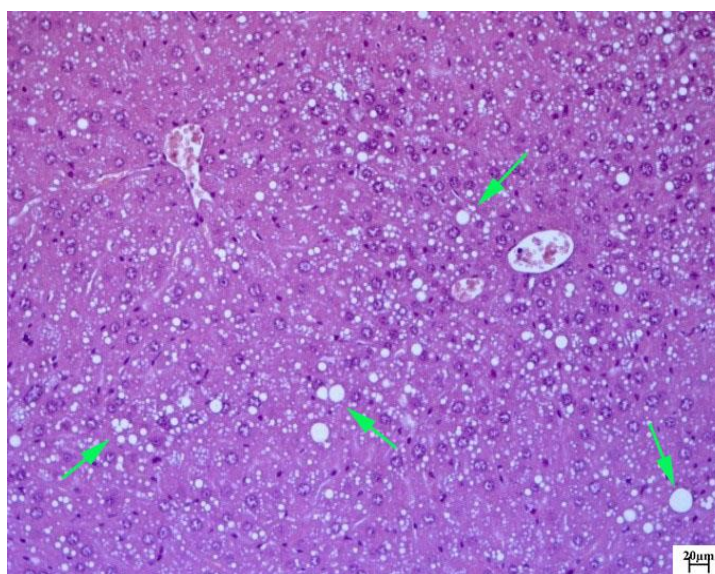


Рисунок 11 - Микрофотография печени мышей группы отрицательного контроля (C57Bl/6J A^y/a). Полиморфная липидная инфильтрация гепатоцитов (зеленые стрелки). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 200$

У мышей C57Bl/6J A^y/a , получавших вилдаглиптин, выраженных признаков нормализации метаболических нарушений не наблюдалось. Ведущим признаком поражения печени также являлась выраженная полиморфная инфильтрация гепатоцитов, с клеточным и ядерным полиморфизмом (рисунок 12). В синусоидах

встречались активированные купферовские клетки (увеличение их размеров и количества). Гликоген в гепатоцитах не определялся.

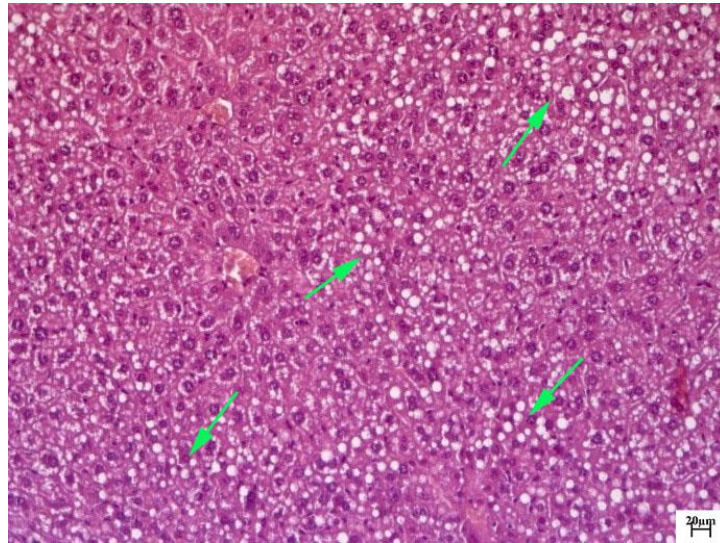


Рисунок 12 – Микрофотография печени мышей, которым вводили видаглиптин в дозе 30 мг/кг. Полиморфная липидная инфильтрация (зеленые стрелки), полиморфизм гепатоцитов. Окраска гематоксилин – эозин. Ув. $\times 200$

У мышей C57Bl/6J A^y/a , получавших QS-528 в течение 14 дней, отмечалась нормализация метаболических нарушений (рисунок 13). В синусоидах встречались активированные купферовские клетки (увеличение их размеров и количества). Гликоген в гепатоцитах не определялся.

У мышей C57Bl/6J A^y/a , получавших QS-619 в течение 14 дней, наблюдалась частичная коррекция метаболических нарушений (рисунок 14). Жировая дистрофия в данной группе была более выражена, чем у животных, получавших QS-528 в течение 14 дней. Большею частью у животных наблюдалась мелковезикулярная жировая дистрофия. Следует отметить повышение регенераторной активности у всех животных в виде гипертрофии гепатоцитов с ядерным полиморфизмом. В синусоидах выявлялись увеличенные в размере купферовские клетки. Визуально отмечалось и сужение просветов синусоидов, что связано с гипертрофией гепатоцитов. Гликоген в гепатоцитах не выявлялся.

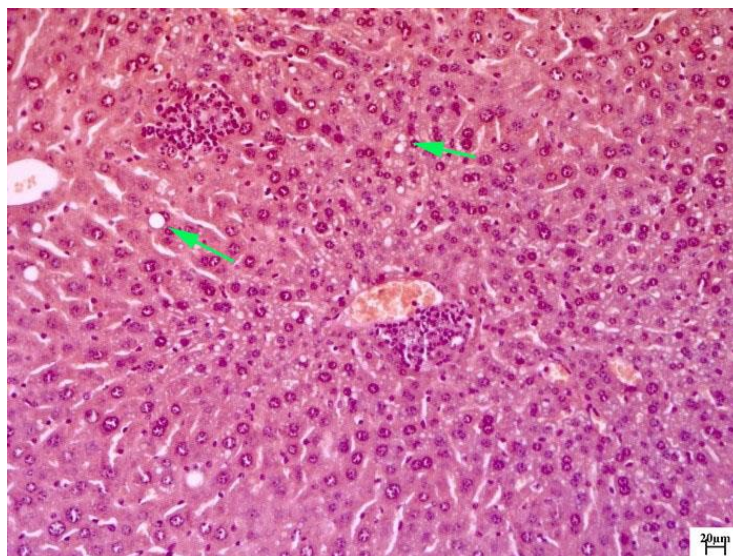


Рисунок 13 – Микрофотография печени мышей, которым вводили QS-528 в дозе 30 мг/кг. Незначительная липидная инфильтрация гепатоцитов (зеленые стрелки). Окраска гематоксилин – эозин. Ув. $\times 200$

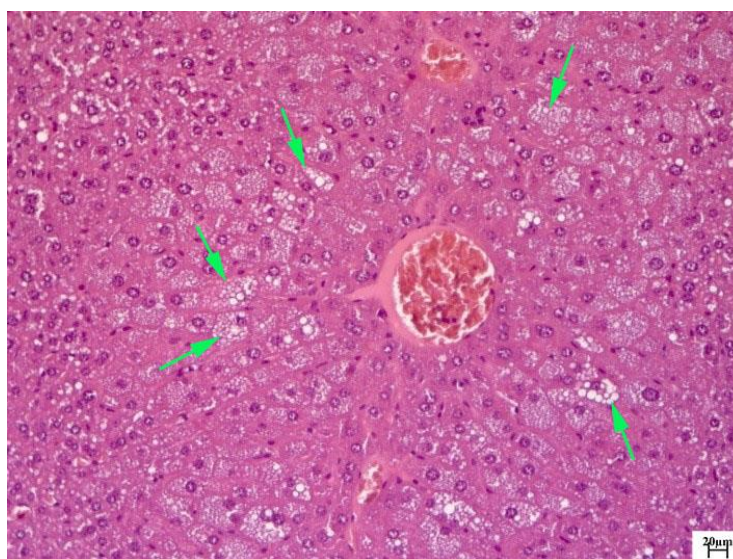


Рисунок 14 – Микрофотография печени мышей, которым вводили QS-619 в дозе 30 мг/кг. Мелковезикулярная жировая дистрофия (зеленые стрелки), гипертрофия гепатоцитов. Окраска гематоксилин – эозин. Ув. $\times 200$

3.3.4 Морфометрическое исследование печени

Для количественной оценки влияния QS-528 и QS-619 на состояние печени мы провели морфометрическое исследование, в котором оценивали объемную плотность гепатоцитов, синусоидов и жировой дистрофии. Чем больше объемная плотность гепатоцитов и синусоидов, и меньше плотность жировой дистрофии печени, тем выраженнее гепатопротекторное действие исследуемых соединений.

Было отмечено, что соединения QS-528 и QS-619 способствуют увеличению объемной плотности гепатоцитов (рисунок 15) и синусоидов (рисунок 16), а также разрешают жировую дистрофию печени (рисунок 17). Однако, наиболее выраженный эффект, как и при визуальной оценке микрофотографий, наблюдался у соединения QS-528, что свидетельствует о наличии у него гепатопротекторного действия.

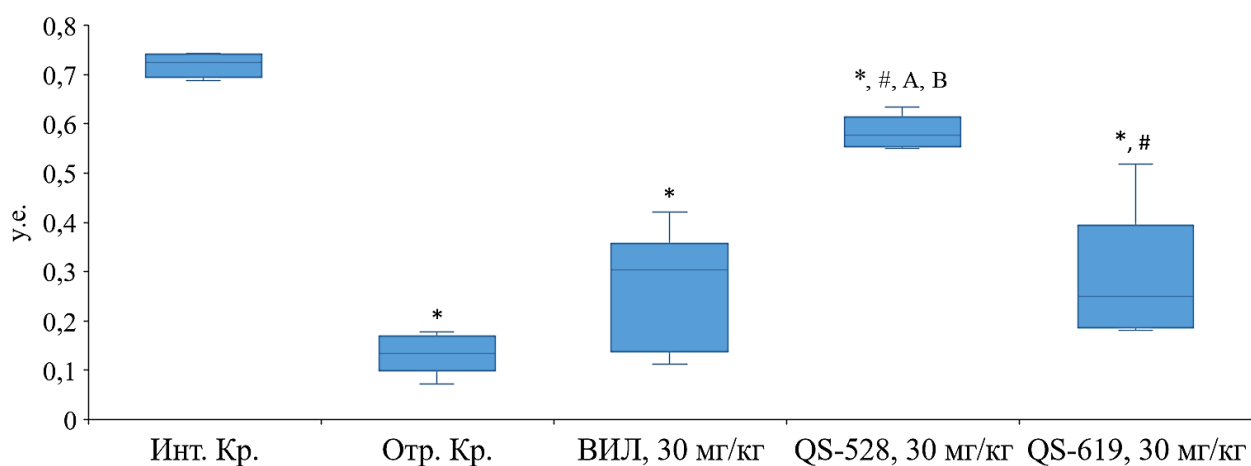


Рисунок 15 – Результаты морфометрического анализа печени (объемная плотность гепатоцитов) ($M \pm qr$) ($n=5$ в каждой группе)

Примечание: * $p \leq 0,05$ по сравнению с интактным контролем; # $p \leq 0,05$ по сравнению с отрицательным контролем; ^A $p \leq 0,05$ по сравнению с ВИЛ 30 мг/кг; ^B $p \leq 0,05$ по сравнению с QS-619 30 мг/кг. У.ед.: условные единицы; Инт. Кр.: интактный контроль; Отр. Кр.: отрицательный контроль; ВИЛ: вилдаглиптин.

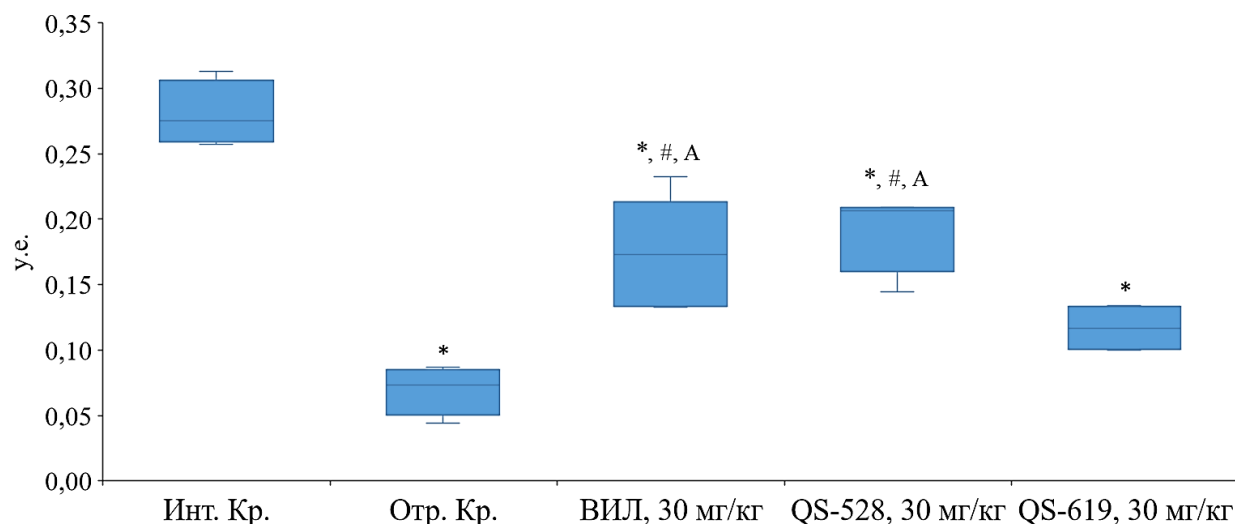


Рисунок 16 – Результаты морфометрического анализа печени (объемная плотность синусоидов печени) ($M \pm qr$) ($n=5$ в каждой группе)

Примечание: * $p \leq 0,05$ по сравнению с интактным контролем; # $p \leq 0,05$ по сравнению с отрицательным контролем; $A p \leq 0,05$ по сравнению с QS-619 30 мг/кг. У.ед.: условные единицы; Инт. Кр: интактный контроль; Отр. Кр: отрицательный контроль; ВИЛ: вилдаглиптин.

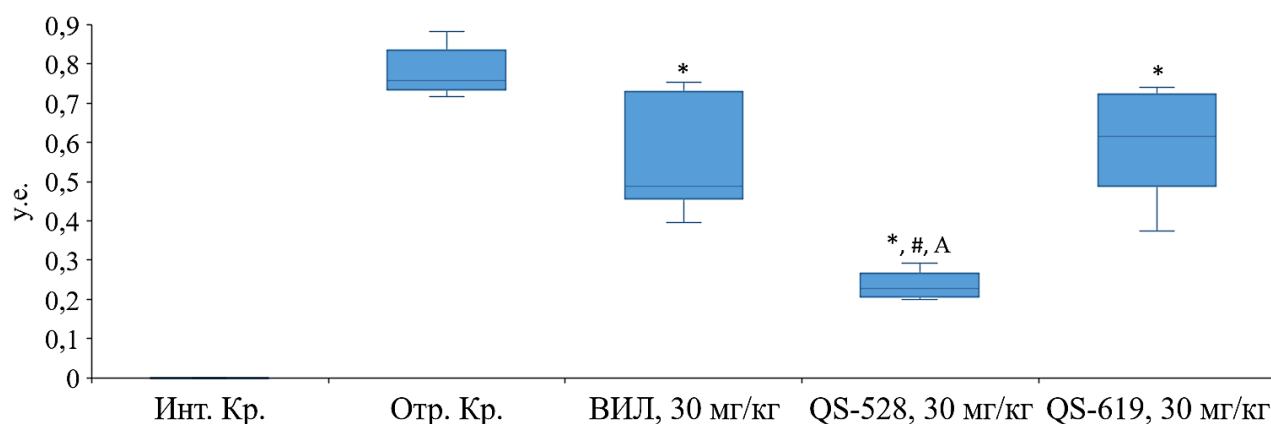


Рисунок 17 – Результаты морфометрического анализа печени (объемная плотность жировой дистрофии печени) ($M \pm qr$) ($n=5$ в каждой группе)

Примечание: * $p \leq 0,05$ по сравнению с отрицательным контролем; # $p \leq 0,05$ по сравнению с вилдаглиптином 30 мг/кг; $A p \leq 0,05$ по сравнению с QS-619 30 мг/кг. У.ед.: условные единицы; Инт. Кр.: интактный контроль; Отр. Кр.: отрицательный контроль; ВИЛ: вилдаглиптин.

Таким образом, по результатам проведенных исследований на генетической модели СД2 было установлено, что соединение QS-619 в дозе 30 мг/кг обладает гипогликемическим действием. Соединение QS-528 в дозе 30 мг/кг

восстанавливает нормальную функцию печени и нормализует липидный обмен у мышей C57Bl/6J A^y/a , тогда как QS-619 лишь частично корректирует метаболические нарушения. Учитывая положительное влияние QS-528 на состояние печени и липидный обмен можно предположить, что снижение его гипергликемического действия после 14 дней введения мышам с СД2 (рисунок 8 и 9) вызвано именно разрешением жировой дистрофии печени, улучшением чувствительности к инсулину и нормализацией липидного обмена. Для мышей линии C57Bl/6J A^y/a характерно развитие не только жирового гепатоза, но и инсулинорезистентности (Carroll L. et al., 2004; Voisey J., van Daal A., 2002), чем, вероятно, обусловлено отсутствие гипогликемического действия соединения QS-528 на генетической модели СД2, наблюдаемого ранее на здоровых мышах CDI. Соединение QS-619, по-видимому, снижает инсулинорезистентность у мышей C57Bl/6J A^y/a , поскольку гипогликемический эффект у этого соединения был обнаружен только через 2 недели от начала введения.

3.4 Изучение гипогликемического действия соединений QS-528 и QS-619 на диет-индуцированной модели сахарного диабета 2 типа

Для подтверждения противодиабетического действия соединения QS-619, обнаруженного на генетически обусловленной модели СД2, мы исследовали его на диет-индуцированной модели СД2, поскольку патогенез развития сахарного диабета у мышей линии C57Bl/6J (Petro A.E. et al., 2004; Surwit R.S. et al., 1988) при содержании на высококалорийной диете подобен патогенезу, наблюдаемому у человека (Surwit R.S. et al., 1988).

3.4.1 Оральный глюкозотолерантный тест на мышах линии C57Bl/6J

Для мышей линии C57Bl/6J, которых длительное время содержат на диете с высоким содержанием жиров и углеводов, характерно наличие гипергликемии, гиперинсулинемии и ожирения (Petro A.E. et al., 2004; Surwit R.S. et al., 1988). Для проведения данного эксперимента мышей содержали на такой диете в течение 7

месяцев, по истечении которых с помощью ОГТТ была подтверждена нарушенная толерантность к глюкозе. После этого животным начали вводить исследуемые соединения и через 2 недели от начала эксперимента провели следующий ОГТТ. По результатам теста было установлено, что в группе отрицательного контроля сохраняется нарушенная толерантность к глюкозе. Это подтверждает повышение уровня глюкозы в крови во всех временных точках по сравнению с группой интактного контроля (рисунок 18). Гликемический профиль соединения QS-528 практически совпал с группой отрицательного контроля, тогда как соединение QS-619 достоверно снизило концентрацию глюкозы в крови у экспериментальных животных через 30 мин после введения глюкозы (рисунок 18). Статистически значимое снижение глюкозы во всех временных точках было обнаружено только при введении метформина (рисунок 18).

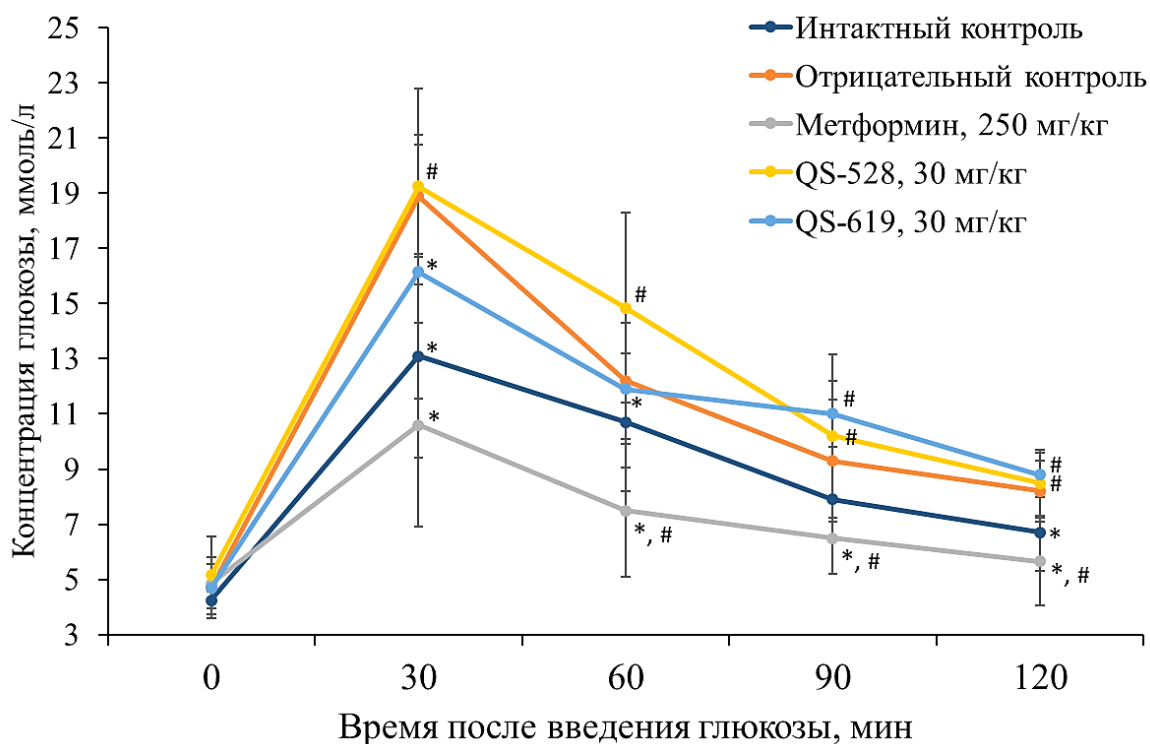


Рисунок 18 – Результаты ОГТТ после 2-х недель введения соединений QS-528 и QS-619 мышам линии C57Bl/6J ($M \pm qr$) ($n=6-8$ в каждой группе)
Примечание: * $p \leq 0,05$ по сравнению с отрицательным контролем; # $p \leq 0,05$ по сравнению с интактным контролем.

Далее животным продолжили вводить тестируемые агенты еще в течение 2-х недель, по истечении которых ОГТТ был проведен повторно. Также была установлена нарушенная толерантность к глюкозе у мышей группы отрицательного контроля (рисунок 19). Гипогликемическое действие было обнаружено у соединения QS-619, что видно как по профилю гликемической кривой (рисунок 19), так и AUC (рисунок 20). Поскольку наибольшее снижение глюкозы было отмечено через 4 недели от начала эксперимента (рисунок 20) можно предположить, что его действие связано с улучшением чувствительности периферических тканей к инсулину. Соединение QS-528 искомой активности не проявило (рисунок 19 и 20). Введение метформина в течение 4-х недель еще более выражено улучшило толерантность мышей к нагрузке глюкозой (рисунок 20).

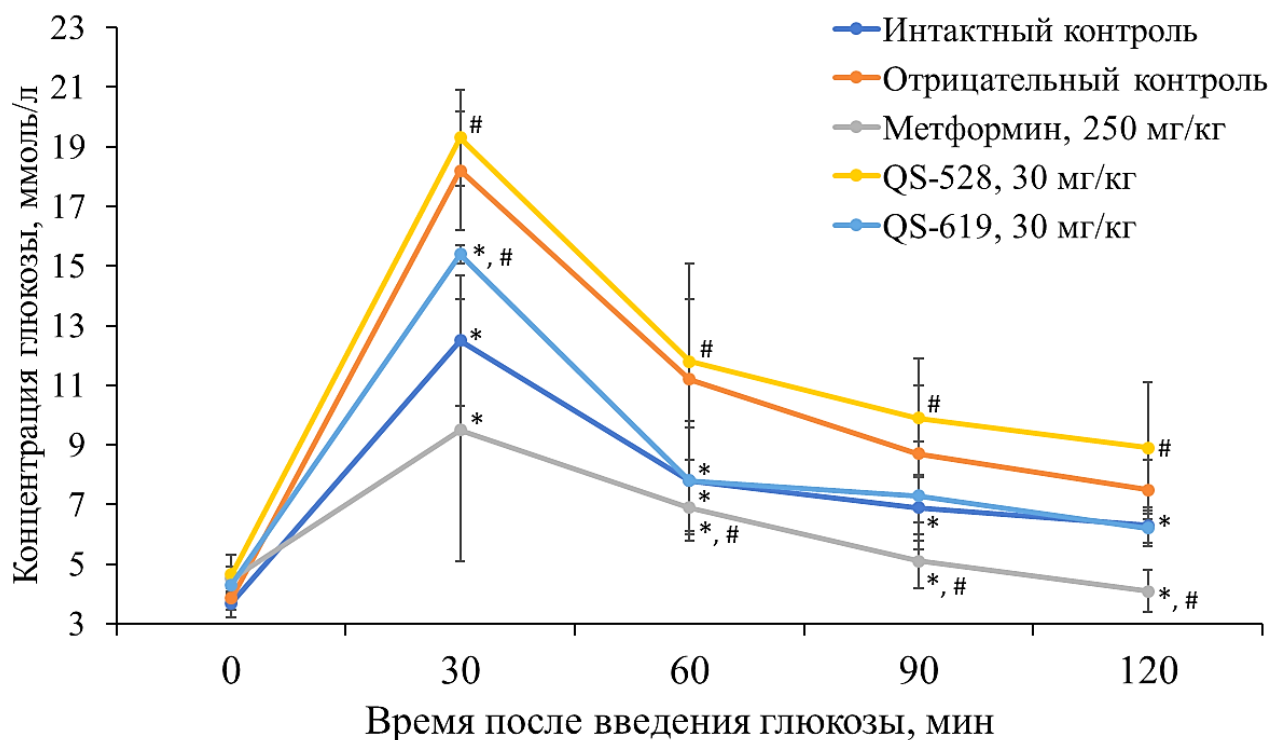


Рисунок 19 – Результаты ОГТТ после 4-х недель введения соединений QS-528 и QS-619 мышам линии C57Bl/6J ($M \pm m$) ($n=6-8$ в каждой группе)
Примечание: * $p \leq 0,05$ по сравнению с отрицательным контролем. # $p \leq 0,05$ по сравнению с интактным контролем.

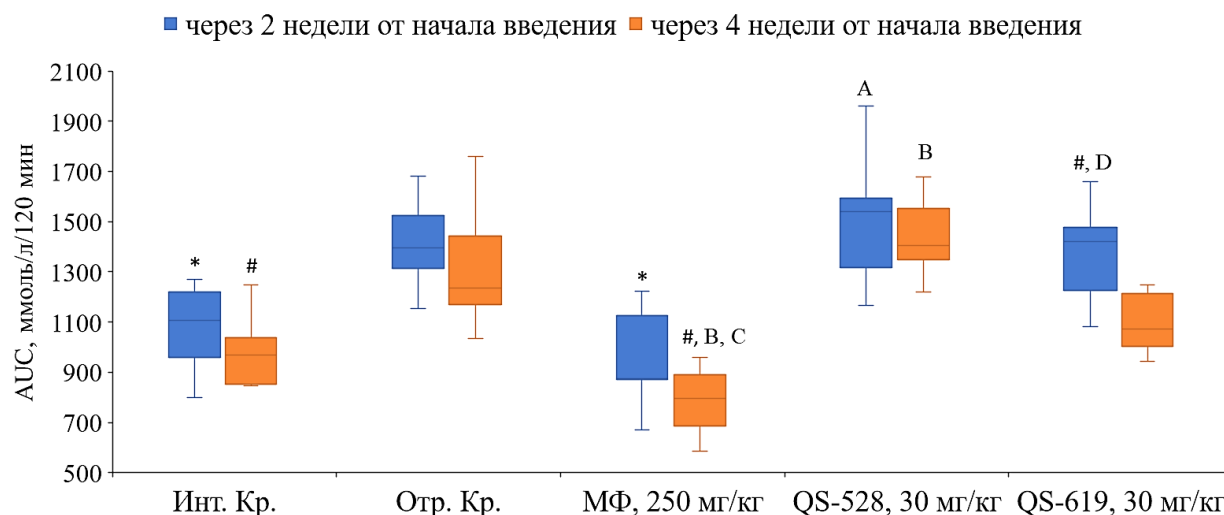


Рисунок 20 – Площадь под гликемической кривой (AUC), рассчитанная по результатам ОГТТ после 2-х и 4-х недельного введения соединений QS-528 и QS-619 мышам линии C57Bl/6J ($M \pm qr$) ($n=6-8$ в каждой группе)

Примечание: * $p \leq 0,05$ по сравнению с отрицательным контролем после 2-х недель введения; # $p \leq 0,05$ по сравнению с отрицательным контролем после 4-х недель введения; ^A $p \leq 0,05$ по сравнению с интактным контролем после 2-х недель введения; ^B $p \leq 0,05$ по сравнению с интактным контролем после 4-х недель введения; ^C $p \leq 0,05$ по сравнению с МФ после 2-х недель введения; ^D $p \leq 0,05$ по сравнению с QS-619 после 2-х недель введения. Инт. Кр.: интактный контроль; Отр. Кр.: отрицательный контроль; МФ: метформин.

3.4.2 Биохимическое исследование крови

В крови мышей оценивали концентрацию ТГ и АЛТ. В группе, получавшей метформин было обнаружено достоверное снижение концентрации ТГ по сравнению с отрицательным контролем. Это обусловлено известным для него механизмом действия, а именно селективным увеличением поглощения/липолиза липопротеинов очень низкой плотности и последующем митохондриальным окислением жирных кислот, опосредованными бурой жировой тканью (Geerling J.J. et al., 2014). В отличие от метформина у соединений QS-528 и QS-619 наблюдалась тенденция к снижению ТГ (рисунок 21). Следовательно, можно сделать предположение, что при более длительном введении исследуемых соединений этот показатель мог стать более низким.

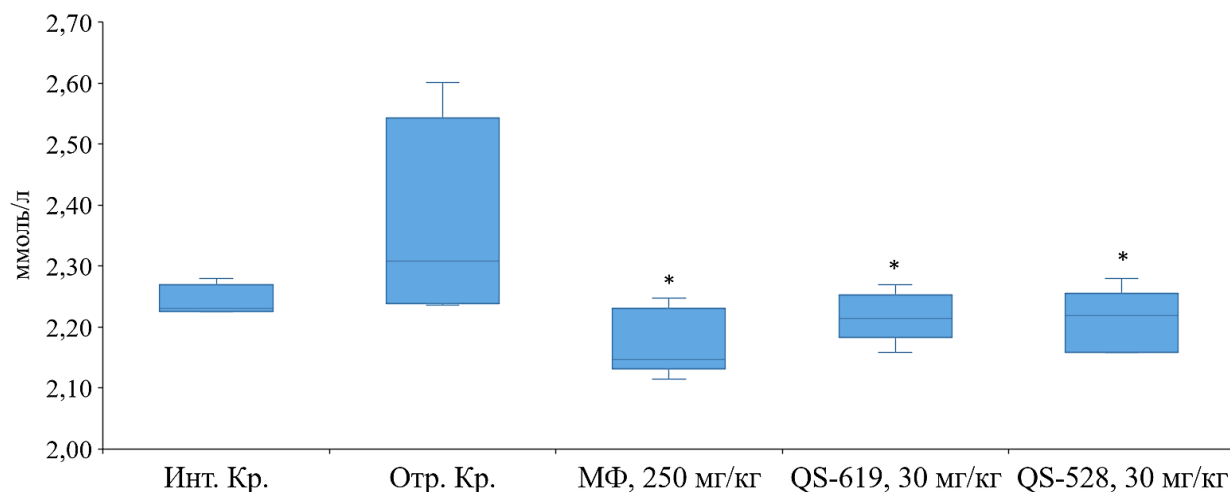


Рисунок 21 – Концентрация ТГ в крови мышей после 4-х недель введения исследуемых соединений ($M \pm qr$) ($n=6-8$ в каждой группе)

Примечание: * $p \leq 0,05$ по сравнению с отрицательным контролем; # $p=0,05-0,1$ по сравнению с отрицательным контролем. Инт. Кр.: интактный контроль; Отр. Кр.: отрицательный контроль; МФ: метформин.

Было установлено, что метформин и соединения QS-528 и QS-619 снижают концентрацию АЛТ в крови мышей как по сравнению с интактным, так и отрицательным контролем (рисунок 22). Это означает, что данные вещества, вероятно, уменьшают повреждение ядерной ДНК и последующую гибель клеток в печени мышей линии C57Bl/6J при содержании их на высококалорийной диете (Guo W.R. et al., 2021; Saeedi Saravi S.S. et al., 2016).

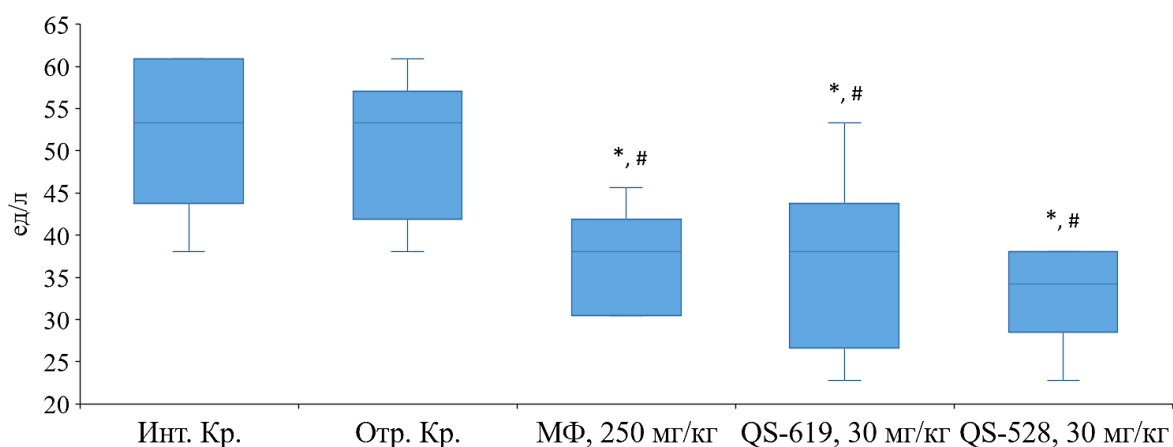


Рисунок 22 – Концентрация АЛТ в крови мышей после 4-х недель введения исследуемых веществ ($M \pm qr$) ($n=6-8$ в каждой группе)

Примечание: * $p \leq 0,05$ по сравнению с интактным контролем; # $p \leq 0,05$ по сравнению с отрицательным контролем. Инт. Кр.: интактный контроль; Отр. Кр.: отрицательный контроль; МФ: метформин.

3.4.3 Гистологическое исследование печени

У животных контрольной группы архитектура печени была сохранена, желчные капилляры, вены и артерии имели типичное строение, признаки патологической инфильтрации, дистрофии в гепатоцитах и фиброза отсутствовали. При окраске по методу ШИК наблюдалось неравномерное распределение гликогена в виде пылевидной зернистости (рисунок 23).

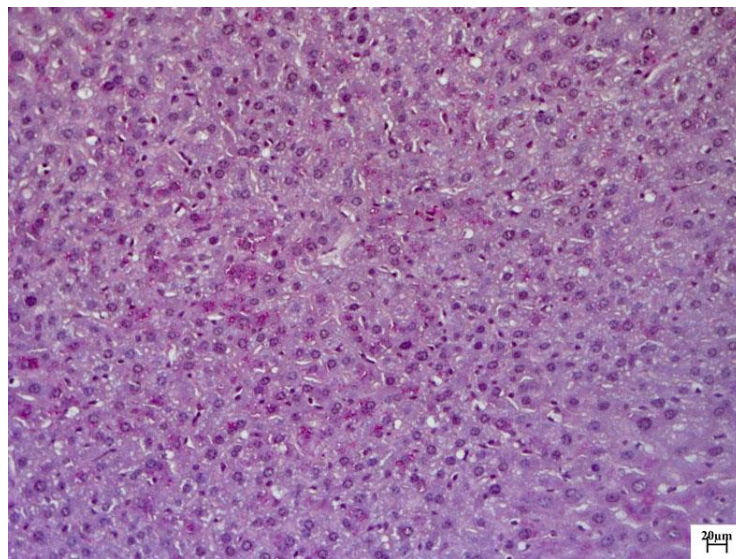


Рисунок 23 – Микрофотография печени контрольных мышей без патологических изменений. Гликоген в отдельных гепатоцитах. Окраска ШИК-гематоксилин-оранжевый G, $\times 200$

В группе животных с диет-индуцированным СД2 отмечалось развитие жирового гепатоза. У всех животных фиксировалась мелкоvesикулярная липидная инфильтрация, очаговые некрозы гепатоцитов, инфильтрированные макрофагами и мононуклеарными лейкоцитами, в перипортальных зонах отмечалась дисконфлексация печеночных балок (рисунок 24). В просвете синусоидов определялись увеличенные в размерах многочисленные клетки Купфера. При окраске по методу ШИК, гликоген в печени не выявлялся.

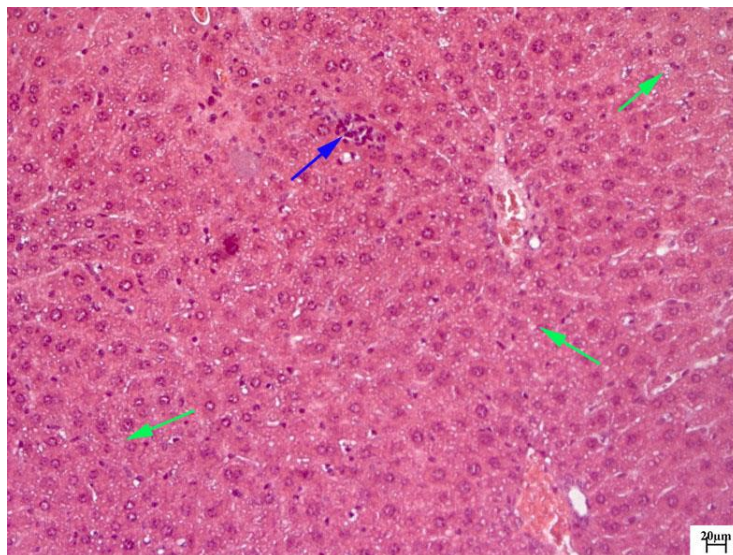


Рисунок 24 – Микрофотография печени мышей группы негативного контроля. Жировая дистрофия (зеленые стрелки) и мелкоочаговый некроз гепатоцитов (синяя стрелка), инфильтрированный монуклеарными клетками. Окраска гематоксилин-эозином, $\times 200$

У животных, получавших метформин, выраженной положительной динамики метаболических нарушений не выявлено, сохранялись признаки жирового гепатоза. В перипортальных зонах наблюдалась дистрофия гепатоцитов, сопровождавшаяся отеком клеток с опустошением цитоплазмы и сохранением ее в виде ободка в перинуклеарной зоне, также наблюдалась мелковезикулярная липидная инфильтрация гепатоцитов (рисунок 25). При окраске по методу ШИК гликоген выявлялся в виде пылевидной зернистости в отдельных клетках.

У мышей, получавших QS-619, сохранялись дегенеративно-некротические, гемодинамические нарушения в печени. На фоне венозного полнокровия выявлялись выраженная мелковезикулярная липидная инфильтрация гепатоцитов, а также их некрозы, имеющие очаговый характер, инфильтрированные моноцитами макрофагами (рисунок 26). Гликоген в гепатоцитах не определялся.

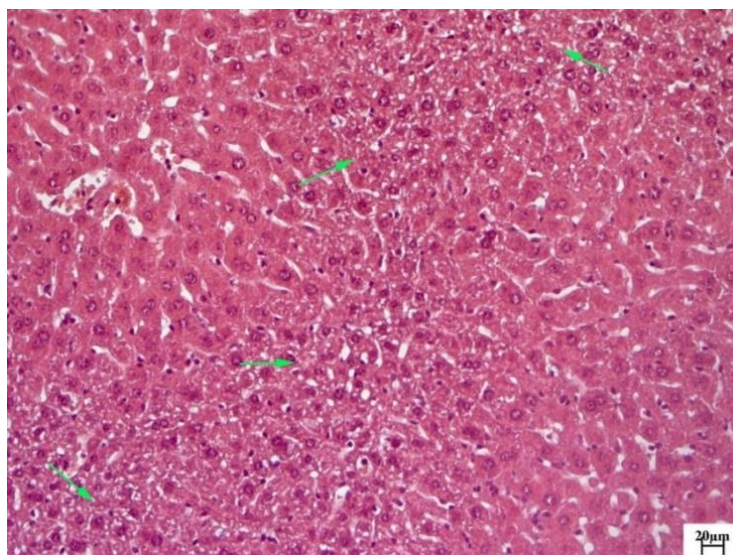


Рисунок 25 – Микрофотография печени мышей, которым вводили метформин в дозе 250 мг/кг. Жировая дистрофия гепатоцитов (зеленые стрелки). Окраска гематоксилин-эзином, $\times 200$

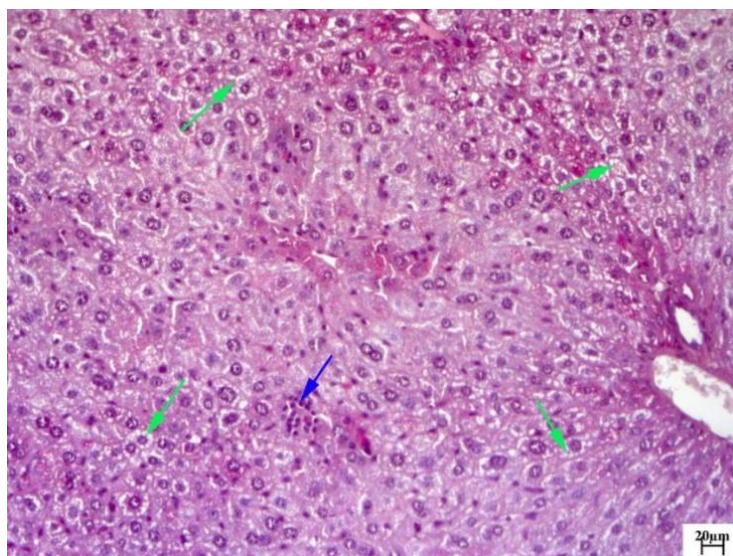


Рисунок 26 – Микрофотография печени мышей, которым вводили QS-619 в дозе 30 мг/кг. Мелковезикулярная липидная инфильтрация гепатоцитов (зеленые стрелки), мелкоочаговый некроз гепатоцитов (синяя стрелка). Окраска ШИК – гематоксилин - оранжевый G, $\times 200$

У животных, получавших соединение QS-528, наблюдалась положительная динамика альтеративных процессов, по сравнению с группой негативного контроля и животными, получавшими метформин. В печени отмечалась регрессия жирового гепатоза, выраженных инфильтративно-некротических, гемодинамических

изменений в печени животных не обнаружено. При окраске по методу ШИК отмечалось неравномерное распределение гликогена в гепатоцитах (рисунок 27).

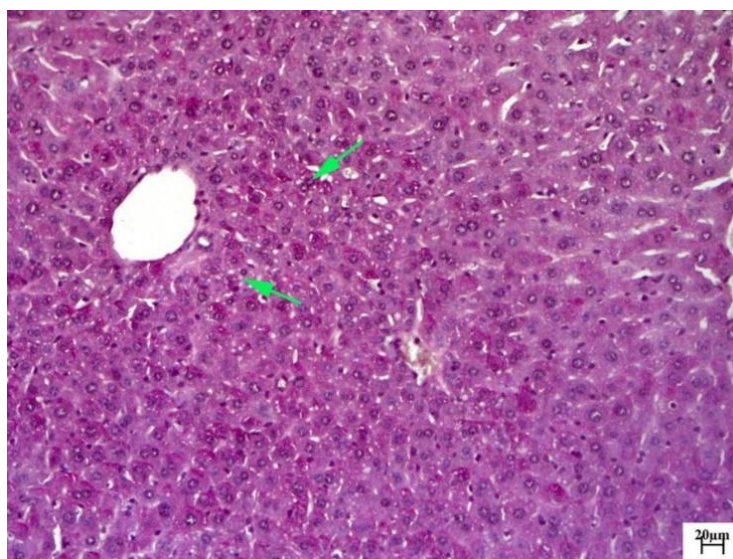


Рисунок 27 – Микрофотография печени мышей, которым вводили QS-528 в дозе 30 мг/кг. Незначительная липидная инфильтрация гепатоцитов (зеленые стрелки). Неравномерное распределение гликогена в гепатоцитах. Окраска ШИК – гематоксилин - оранжевый G, $\times 200$

Таким образом, по результату проведенного эксперимента на диет-индуцированной модели СД2 было обнаружено, что гипогликемической активностью обладает только QS-619 (рисунок 19 и 20). Гипергликемическое действия QS-528, наблюдаемое ранее в эксперименте на генетически обусловленной модели СД2 (рисунок 9), отсутствовало у мышей C57Bl/6J, находящихся на высококалорийной диете, что вероятно, связано с менее выраженной жировой дистрофией печени и нарушенном липидном обмене, которое отчетливо проявляется у мышей C57Bl/6J A^{y/a} (Lebedev P. et al., 2022; Nagarajan P. et al., 2012). Полученные результаты о влиянии соединения QS-528 на состояние печени мышей C57Bl/6J свидетельствуют о его гепатопротекторном эффекте, который подтверждает данные, полученные ранее на мышах C57Bl/6J A^{y/a}.

3.5 Изучение механизма действия соединений QS-528 и QS-619

3.5.1 Определение способности соединения QS-619 активировать FFAR1

Ранее в исследовании было установлено, что QS-528 является агонистом FFAR1 (Kuranov S.O. et al., 2020). Поскольку QS-619 является его структурным аналогом и, следовательно, потенциально может связываться с данным рецептором необходимо было оценить его способность связываться с FFAR1. По результату эксперимента было обнаружено, что QS-619 активирует FFAR1 в концентрации 10 μ M, не уступая эталонному агонисту GW9508 и своему структурному аналогу – QS-528 (рисунок 28). Следовательно, QS-619, как и QS-528 является агонистом FFAR1.

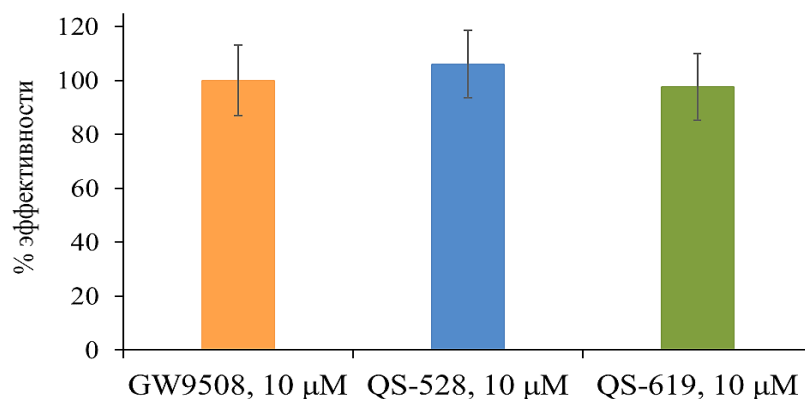


Рисунок 28 – Способность соединений QS-528 и QS-619 активировать FFAR1 ($S \pm m$). % эффективности рассчитывали относительно максимальной активности, проявляемой GW9508 в концентрации 10 μ M

3.5.2 Определение способности соединений QS-528 и QS-619 ингибировать фермент DPP-4

При исследовании соединений QS-528 и QS-619 на генетически обусловленной модели СД2 было обнаружено гипергликемическое действие соединения QS-528 после однократного введения (рисунок 8 и 9). Опираясь на данные литературы и наблюдаемого ранее снижения гипогликемического действия вилдаглиптина (рисунок 6), являющегося ингибитором фермента DPP-4, мы предположили, что гипергликемическое действие QS-528, вероятно, связано с ингибированием данного фермента и соответственно повышением концентрации

GIP, который, в свою очередь, стимулирует секрецию глюкагона и повышает концентрацию глюкозы в крови за счет гликогенолиза и глюконеогенеза (Lambeir A.M. et al., 2003). Поэтому, помимо активации FFAR1, нам было важно оценить способность QS-528 и QS-619 ингибировать фермент DPP-4. Было проведено исследование *in vitro*, по результатам которого было обнаружено, что QS-528 и QS-619 в концентрации 100 μM , в отличие от эталонного ингибитора DPP-4 – ситаглиптина, достоверно не снижают активность этого фермента (таблица 9). Следовательно, они не являются ингибиторами фермента DPP-4. Исходя из этого можно предположить, что гипергликемическое действие QS-528 связано с активацией FFAR1 на энтероэндокринных клетках кишечника и последующем индуцировании секреции GIP (Li Z. et al., 2018).

Таблица 9 – Способность соединений QS-528 и QS-619 снижать активность DPP-4 ($S \pm m$)

	Активность фермента DPP-4, %
Отсутствие воздействия соединений на DPP-4	$100 \pm 12,5$
Ситаглиптин, 100 μM	$0,2 \pm 0,2^*$
QS-619, 100 μM	$81,8 \pm 4,2$
QS-528, 100 μM	$89,9 \pm 3,7$

Примечание: $*p \leq 0,05$ по сравнению с активностью фермента DPP-4 при отсутствии введения исследуемых соединений.

3.5.3 Определение концентрации инсулина и GIP

Как было отмечено ранее, механизм действия агонистов FFAR1 связан со стимуляцией секреции инсулина β -клетками ПЖ. Она может быть индуцирована как непосредственным взаимодействием агониста с FFAR1 на β -клетках ПЖ, так и опосредованно за счет связывания агониста FFAR1 с соответствующим рецептором на энтероэндокринных клетках кишечника, что приводит к секреции инкретинов - GLP-1, GIP, которые взаимодействуют с GLP-1R, рецепторами GIP на β -клетках ПЖ и усиливают секрецию инсулина (Governi P. et al., 2021; Li Z. et al., 2018). Гормон GIP также может связываться с соответствующим рецептором на α -клетках ПЖ и стимулировать секрецию глюкагона, в результате чего гипогликемическое

действие некоторых препаратов может снижаться или полностью пропадать (El K., Campbell J.E., 2020).

В зависимости от того, связываются ли агонисты только с FFAR1 на β -клетках ПЖ или способны взаимодействовать как с FFAR1 на β -клетках, так и энтероэндокринных клетках кишечника выделяют частичные и полные агонисты FFAR1 соответственно (Hauge M. et al., 2015; Li Z. et al., 2020). Поэтому после обнаружения связывания соединений QS-528 и QS-619 с FFAR1 следующим этапом работы было определение способности этих соединений стимулировать секрецию инсулина и инкретинов, в частности GIP.

Мы исследовали концентрацию инсулина в сыворотке крови мышей CDI после однократного введения QS-528 и QS-619 в дозе 30 мг/кг. Было установлено, что оба соединения стимулируют секрецию инсулина, не уступая эталонному препарату вилдаглиптину в дозе 10 мг/кг (рисунок 29).

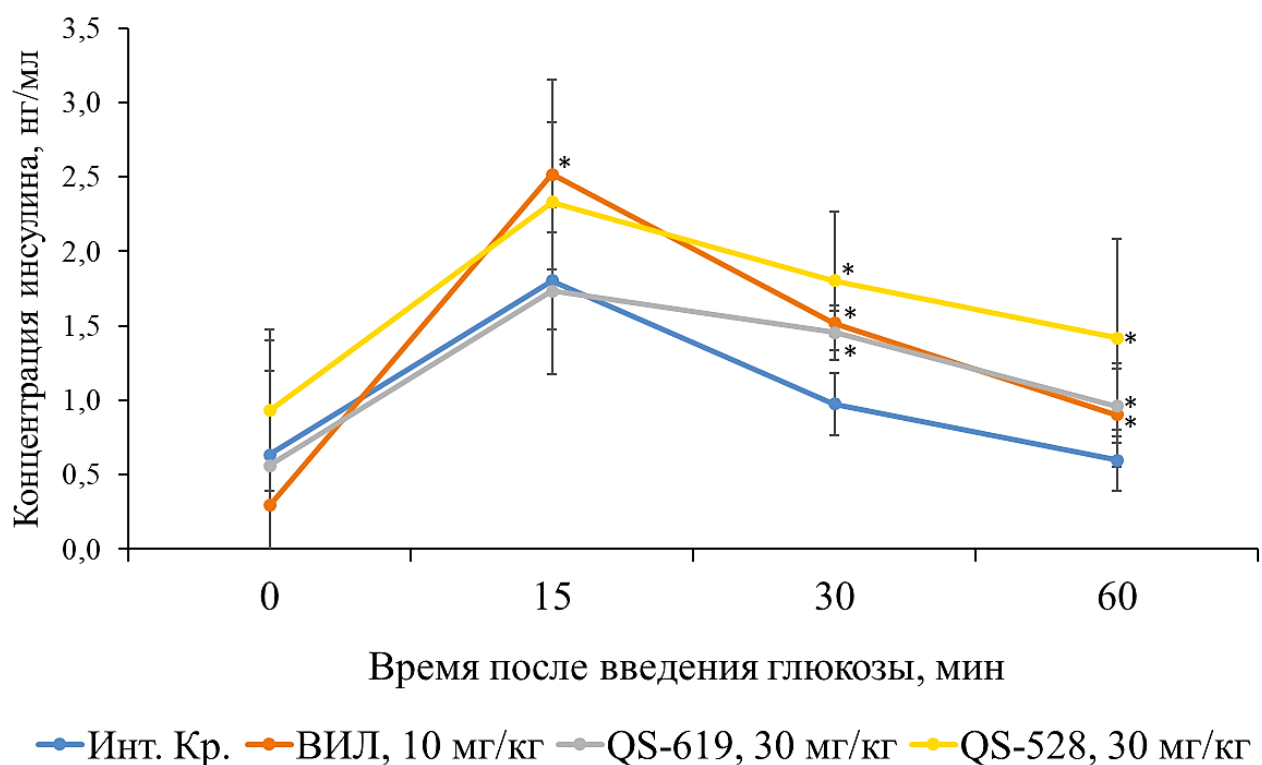


Рисунок 29 – Концентрация инсулина в крови мышей CDI после однократного введения QS-528 и QS-619 ($M \pm qr$) ($n=5$ в каждой группе)

Примечание: * $p \leq 0,05$ по сравнению с группой интактного контроля.

ВИЛ: вилдаглиптин.

Далее мы исследовали способность наших соединений повышать концентрацию GIP в крови мышей. Стоит отметить, что в данной работе мы исследовали только концентрацию GIP, а не GLP-1, так как нам было важно подтвердить, что гипергликемическое действие QS-528 на мышах линии C57Bl/6J A^{y/a} вызвано повышением концентрации GIP в крови животных, что, вероятно, обусловлено связыванием этого соединения с FFAR1 (Hauge M. et al., 2015; Lambeir A.M. et al., 2003). По результатам эксперимента было обнаружено, что QS-528 и QS-619 в дозе 30 мг/кг после однократного введения мышам CDI увеличивают концентрацию GIP в крови через 5 и 10 минут после введения глюкозы (рисунок 30), что подтверждает нашу теорию относительно гипергликемического действия QS-528.

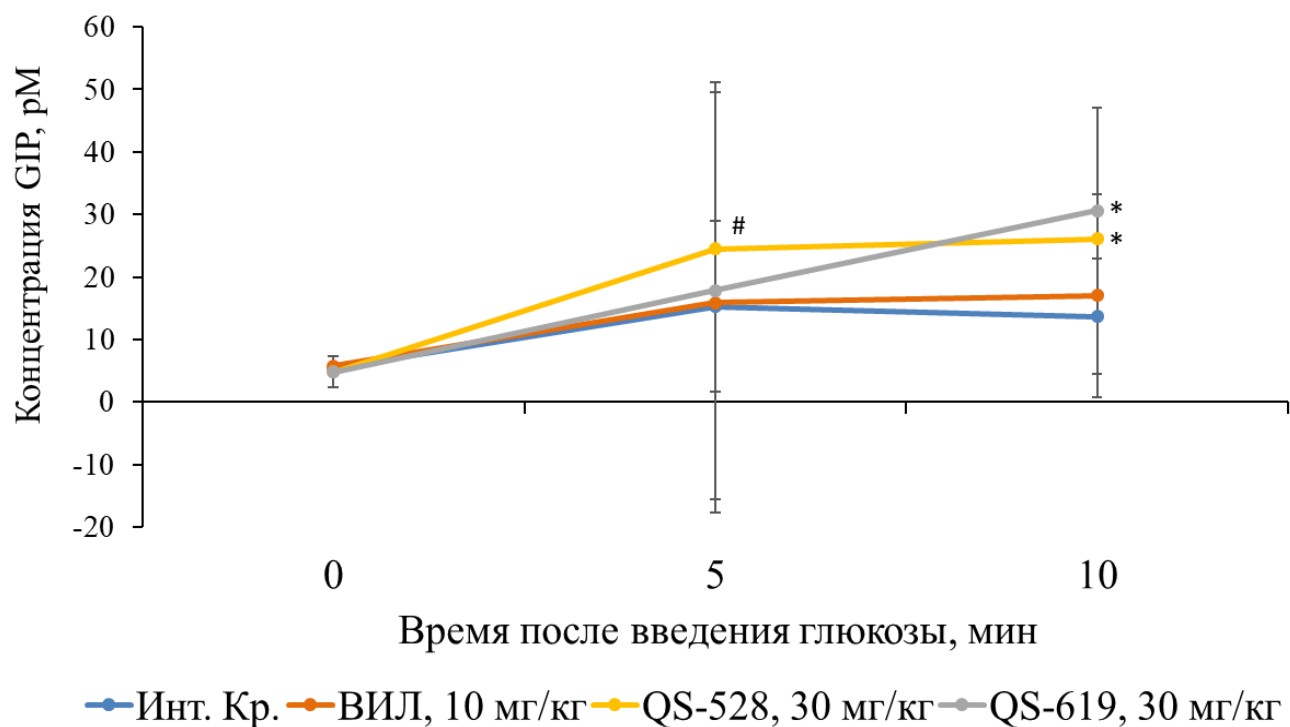


Рисунок 30 – Концентрация GIP в крови мышей CDI после однократного введения QS-528 и QS-619 ($M \pm qf$) ($n=7$ в каждой группе)

Примечание: * $p \leq 0,05$ по сравнению с группой интактного контроля, [#] $p=0,1-0,05$ по сравнению с группой интактного контроля. GIP: глюкозозависимый инсулиноотропный полипептид; ВИЛ: вилдаглиптин.

Таким образом, было установлено, что QS-528 и QS-619 являются агонистами FFAR1 и стимулируют секрецию как инсулина, так и GIP. На основании этого, можно сделать предположение, что исследуемые соединения являются полными агонистами FFAR1 (Hauge M. et al., 2015), т.е. связываются с рецептором как на β -клетках ПЖ, так и на энтероэндокринных клетках кишечника, соответственно. Стоит отметить, что динамика изменения концентрации инсулина и GIP в крови животных при введении тестируемых агентов и вилдаглиптина была различной, что, вероятно, связано с их разным механизмом действия (Ahren B. et al., 2011; Burant C.F., 2013).

3.6 Исследование острой токсичности

Острая токсичность определяется как оценка неблагоприятных изменений, развивающихся сразу или в течении короткого промежутка времени после однократного введения вещества или нескольких доз, вводимых в течение 24 часов. Чаще всего термин «острая токсичность» используется для определения летальности и LD₅₀ – статистически полученной дозы, которая в тесте на острую токсичность, как ожидается, вызовет смерть 50% животных в течение определенного периода времени (Walum E., 1998).

По результатам исследования острой токсичности соединений QS-528 и QS-619 в дозе 1000 мг/кг *per os* мы не наблюдали летальность, изменения внешнего вида и поведения животных. Не было обнаружено отрицательного влияния исследуемых соединений на изменение массы тела мышей на протяжении 10 дней исследования (рисунок 31). Следовательно, LD₅₀ соединений QS-528 и QS-619 составила более 1000 мг/кг, что относит данные соединения согласно ГОСТу 12.1.007-76 (Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности) к 3-му классу умеренно опасных веществ. Это, в свою очередь, делает QS-528 и QS-619 безопасным для длительного применения, что является чрезвычайно важной характеристикой потенциального лекарственного средства.

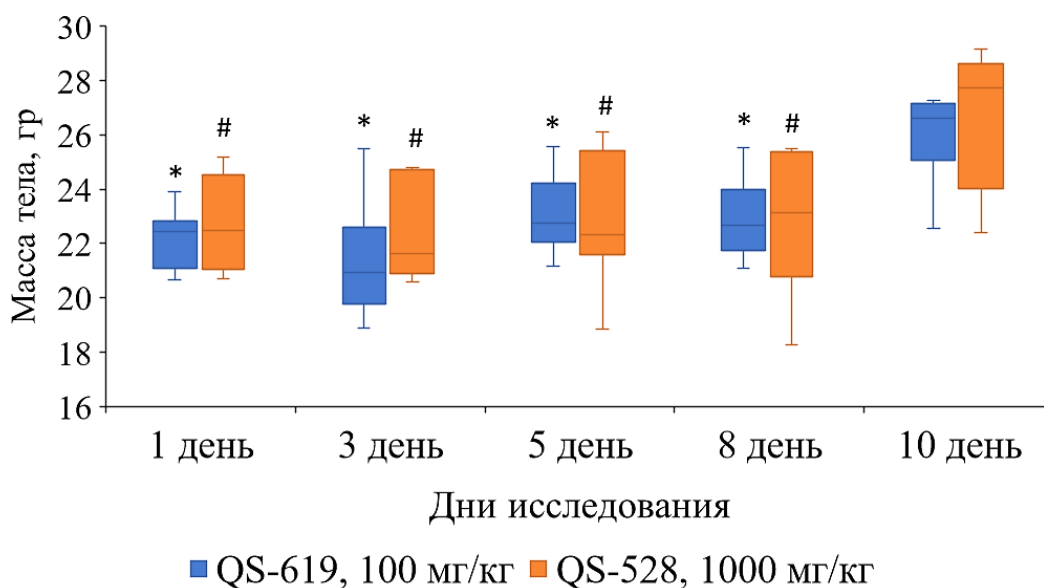


Рисунок 31 – Изменение массы тела мышей CD-1 после однократного введения QS-528 и QS-619 в дозе 1000 мг/кг ($M \pm qg$) ($n=8$ в каждой группе)

Примечание: * $p \leq 0,05$ по сравнению с массой мышей на 10-й день эксперимента, которым вводили QS-619; # $p \leq 0,05$ по сравнению с массой мышей на 10-й день эксперимента, которым вводили QS-528.

3.7 Изучение гепатопротекторного действия соединения QS-528 на тетрахлорметан – индуцированной модели гепатотоксичности

Учитывая полученные данные о положительном влиянии QS-528 на состояние печени мышей с СД2, мы продолжили его изучение на модифицированной модели CCl_4 – индуцированной гепатотоксичности (Kojima-Yuasa A. et al., 2016). Повреждение печени, вызванное CCl_4 , обычно используется для проведения скрининга гепатопротекторных соединений (Delgado-Montemayor C. et al., 2015). CCl_4 является мощным гепатотоксином, способным вызывать повреждение печени за счет активации свободных радикалов - трихлорметила ($CCl_3\bullet$) и трихлорметилпероксила ($CCl_3OO\bullet$), опосредованной цитохромом P450. Образующиеся из CCl_4 высокореакционноспособные радикалы воздействуют на гепатоциты и вызывают структурно-функциональные изменения их клеточных мембран, что, в свою очередь приводит к развитию мелкоvesикулярной дистрофии, воспалению, некрозу и фиброзу печени (Mohi-Ud-Din R. et al., 2019; Weber L.W.D., 2003). В зависимости от дозы тетрахлорметана, способа и кратности его введения

можно моделировать повреждения печени разной степени выраженности (Abdelaziz D.H.A., Ali S.A., 2014; Lu Y. et al., 2016). С помощью этого гепатотоксина можно очень просто добиться тотального некроза гепатоцитов (Yannaki E. et al., 2005), однако против такого сильного воздействия очень сложно найти защиту. В случае применения более щадящего протокола его введения имеется возможность моделировать повреждения печени, которые будут ближе по своей выраженности к наблюдаемым при метаболических нарушениях (Dai N. et al., 2014; Zhang G. et al., 2020) или нарушениях, связанных с приемом ксенобиотиков, например лекарств (Sturgill M.G., Lambert G.H., 1997).

В данном эксперименте мы использовали несколько доз соединения QS-528, а именно 60, 90, 120, 150 мг/кг. Исследуемое соединение вводили *per os* в течение 3-х недель самцам мышей CDI, после чего проводили биохимическое исследование крови, гистологическое и морфометрическое исследование печени.

3.7.1 Биохимическое исследование крови

По результату биохимического анализа крови в группе отрицательного контроля наблюдалось повышение уровня АЛТ, АСТ и ЩФ (таблица 10), что связано с умеренным повреждением гепатоцитов и поступлением печеночных ферментов в кровоток под воздействием CCl_4 (Osadebe P.O. et al., 2012). Соединение QS-528 дозозависимо снижало концентрацию АЛТ в крови мышей, причем более выраженный эффект наблюдали в дозе 120 и 150 мг/кг (таблица 10). Также было отмечено снижение концентрации АСТ при введении QS-528 в дозе 120 мг/кг аналогично группе положительного контроля (таблица 10). Кроме того, наблюдалась тенденция к снижению ЩФ (таблица 10), что свидетельствует о стабилизации дисфункции билиарного тракта мышей при хронической интоксикации CCl_4 (Yang L. et al., 2011). Концентрация общего белка была одинакова во всех исследуемых группах и соответствовала уровню интактного контроля (таблица 10), что указывает на сохранение синтетической функции печени и рассматривается как дополнительный гепатопротекторный механизм, который ускоряет процесс регенерации гепатоцитов (Yang L. et al., 2011).

Таблица 10 – Биохимический анализ крови мышей CDI после 3-х недель введения соединения QS-528 ($M \pm qg$) ($n=9$ в каждой группе)

	АЛТ, ед/л	АСТ, ед/л	ЩФ, ед/л	ОБ, г/дл
Интактный контроль	12,23 $\pm$ 8,16*	40,06 $\pm$ 13,35*	46,87 $\pm$ 24,81*	85,15 $\pm$ 1,83
Отрицательный контроль	24,50 $\pm$ 3,50	52,50 $\pm$ 13,13	66,17 $\pm$ 13,79	86,03 $\pm$ 3,34
Силимарин, 100 мг/кг	21,00 $\pm$ 5,25*	40,25 $\pm$ 10,50*	41,36 $\pm$ 19,30*	82,77 $\pm$ 4,65
QS-528, 60 мг/кг	20,39 $\pm$ 8,16*	42,74 $\pm$ 19,43	79,95 $\pm$ 52,38	85,28 $\pm$ 5,37
QS-528, 90 мг/кг	24,47 $\pm$ 4,08	57,23 $\pm$ 17,17	74,44 $\pm$ 16,54	86,33 $\pm$ 1,44
QS-528, 120 мг/кг	20,39 $\pm$ 8,16*	41,13 $\pm$ 10,50*	57,90 $\pm$ 34,46	84,76 $\pm$ 4,19
QS-528, 150 мг/кг	14,27 $\pm$ 4,08* [#]	45,78 $\pm$ 11,45	63,41 $\pm$ 35,84	83,58 $\pm$ 4,06

Примечание: * $p \leq 0,05$ по сравнению с отрицательным контролем; [#] $p \leq 0,05$ по сравнению с силимарином 100 мг/кг. АЛТ: аланинаминотрансфераза; АСТ: аспаратаминотрансфераза, ЩФ: щелочная фосфатаза; ОБ: общий белок.

3.7.2 Гистологическое исследование печени

По результатам гистологического исследования было обнаружено, что у мышей группы интактного контроля архитектура печени сохранена, желчные капилляры, вены и артерии имели типичное строение. В гепатоцитах наблюдалась мелкоvesикулярная липидная инфильтрация, популяция гепатоцитов характеризовалась незначительной гетерогенностью: по размеру клеток и ядер. В синусоидах определялись купферовские клетки и мононуклеарные лейкоциты (рисунок 32).

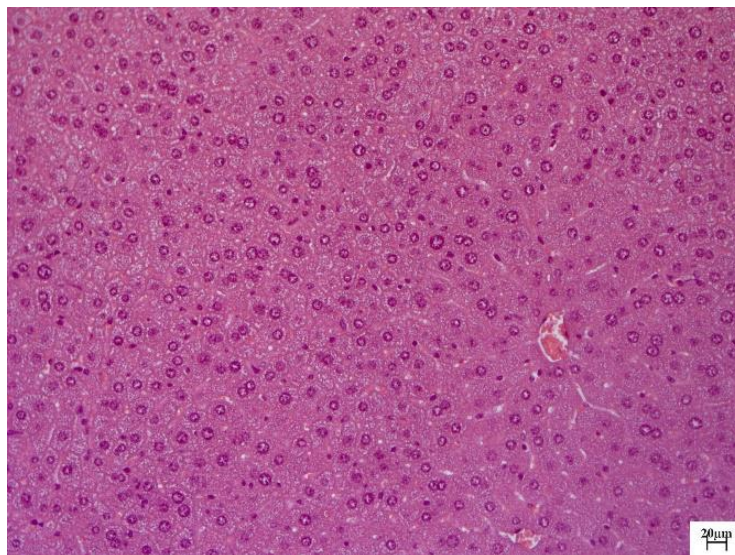


Рисунок 32 – Микрофотография печени мышей группы интактного контроля. В гепатоцитах - мелковезикулярная липидная инфильтрация, гетерогенность популяции гепатоцитов: различия по размеру клеток и ядер. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. $\times 200$

У животных в группе негативного контроля выявлены признаки хронического токсического поражения печени. Однако, вызванные CCl_4 изменения печени животных оказались значимыми, но не вызвали обширного некроза гепатоцитов. Преобладающим видом дистрофии являлась мелковезикулярная. В печени наблюдались мелкоочаговые некрозы гепатоцитов с выраженной лимфоцитарной инфильтрацией и с тельцами Каунсилмена в синусоидах (рисунок 33). На фоне описанных выше поражений наблюдалось повышение регенераторной активности гепатоцитов (митозы), что проявлялось выраженным ядерным и клеточным полиморфизмом. Регенерация в данной группе неполная, реализуется путем гипертрофии и гиперплазии гепатоцитов. Портальные тракты расширены, инфильтрированы лимфоцитами, макрофагами. На фоне выраженного венозного полнокровия отмечалось тотальное сужение синусоидального русла с признаками повышенной активности купферовских клеток, что сопровождается нарушением транссинусоидального обмена, холестазом.

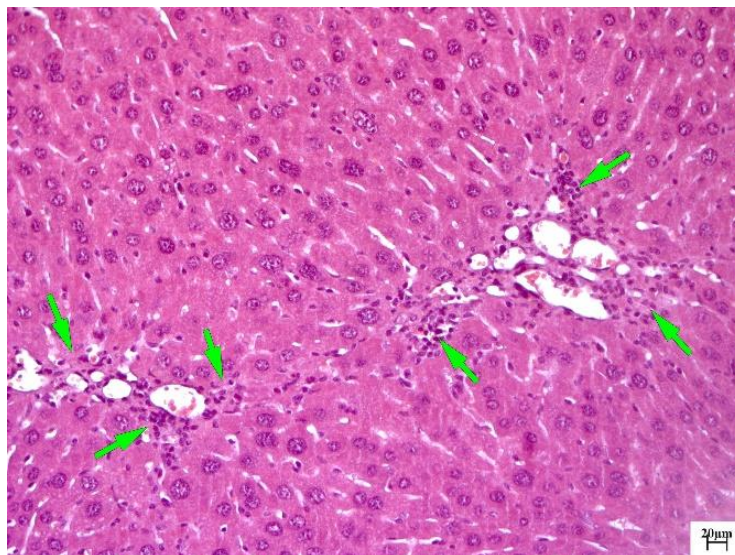


Рисунок 33 – Микрофотография печени мышей, которым вводили только CCl_4 . Перипортальные некрозы (зеленые стрелки), инфильтрированные лимфоцитами, жировая инфильтрация и гетерогенность популяции гепатоцитов: различия по размеру клеток и ядер. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. $\times 200$

На фоне введения силимарина в дозе 100 мг/кг отмечалась положительная динамика патологического процесса. Сохранялись умеренно выраженные признаки токсического поражения печени в виде мелкоvesикулярной жировой дистрофии, мелкоочаговых некрозов гепатоцитов (рисунок 34). В печени фиброзные изменения наблюдаются в виде тонких тяжей, распространяющихся преимущественно перисинусоидально. Тяжи соединительной ткани инфильтрированы макрофагами, мононуклеарными лейкоцитами. В синусоидах встречается большое количество активированных купферовских клеток, что может свидетельствовать о сохранении процессов фиброобразования. Отмечался более мономорфный характер популяции гепатоцитов: признаки ядерно-клеточного полиморфизма слабо выражены, визуально отмечалось увеличение количества гепатоцитов.

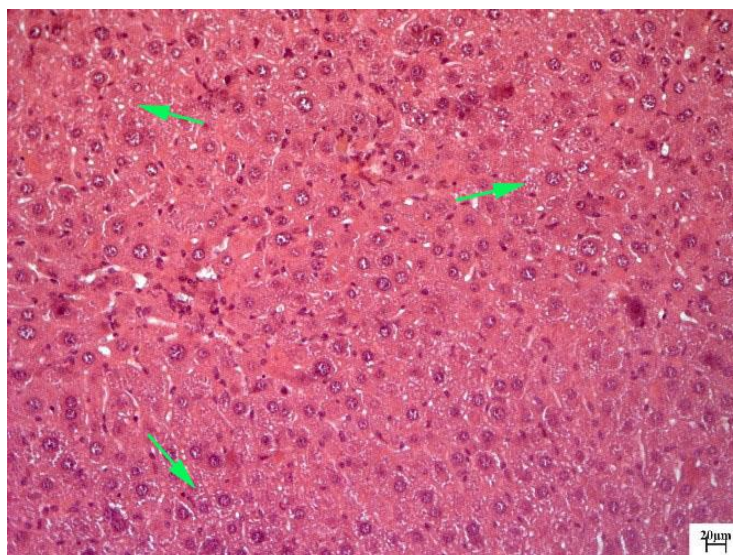


Рисунок 34 – Микрофотография печени мышей, которым вводили силимарин в дозе 100 мг/кг и CCl_4 . Мелковезикулярная дистрофия гепатоцитов (зеленые стрелки), тонкие нити соединительной ткани, отсутствие клеточного и ядерного полиморфизма гепатоцитов. Окраска гематоксилин-эозин, Ув. $\times 200$

При введении соединения QS-528 в дозе 60 и 90 мг/кг незначительно уменьшилась степень выраженности дистрофических изменений гепатоцитов. Также, как и в группе негативного контроля, в гепатоцитах наблюдалась мелковезикулярная липидная дистрофия. Ярко выражен полиморфизм гепатоцитов, обусловленный повышенной регенераторной активностью (рисунок 35). Репаративная регенерация в данном случае являлась неполной и реализовалась по механизму компенсаторной гиперплазии и гипертрофии. В перипортальных зонах отмечались некрозы клеток, инфильтрированные лимфоцитами, макрофагами (рисунок 36). Синусоиды сужены, в их просветах определялись купферовские клетки, моноциты. Введение препарата в данной дозе не оказало выраженного влияния на степень развития фиброзных изменений.

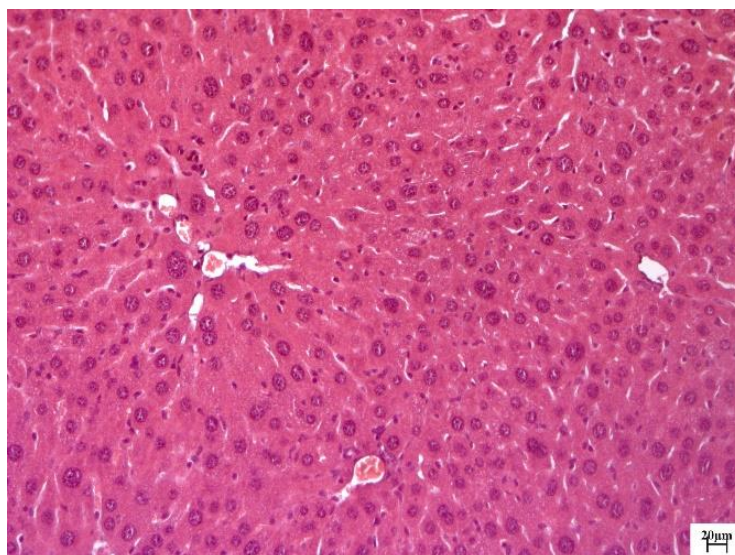


Рисунок 35 - Микрофотография печени мышей, которым вводили CCl_4 и QS-528 в дозе 60 мг/кг. Выраженная гипертрофия гепатоцитов и гиперплазия ядер. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. $\times 200$

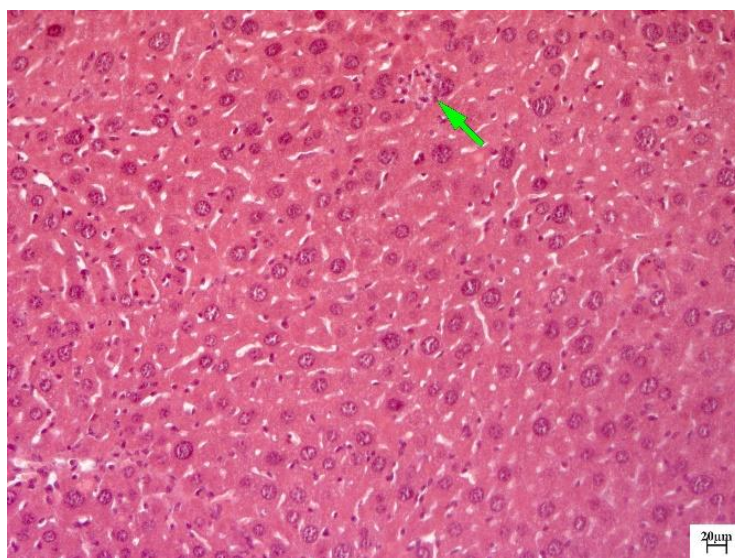


Рисунок 36 - Микрофотография печени мышей, которым вводили CCl_4 и QS-528 в дозе 90 мг/кг. Некроз клеток (зеленая стрелка), инфильтрированный лимфоцитами, макрофагами. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. $\times 200$

Введение соединения QS-528 в дозе 120 и 150 мг/кг оказало более положительное влияние на течение репаративных процессов по сравнению с его введением в меньших дозах. Гетерогенность гепатоцитов проявлялась в виде незначительного волнения ядер. Мелковезикулярная липидная дистрофия регистрировалась у отдельных животных и носила очаговый характер (рисунок 37

и 38). Перипортально наблюдались крупные клетки (макрофаги) с ШИК – позитивной цитоплазмой. В синусоидах выявлялись купферовские клетки, лимфоциты. Репаративная регенерация в данном случае реализуется по механизму компенсаторной гиперплазии, что характерно для полиплоидии.

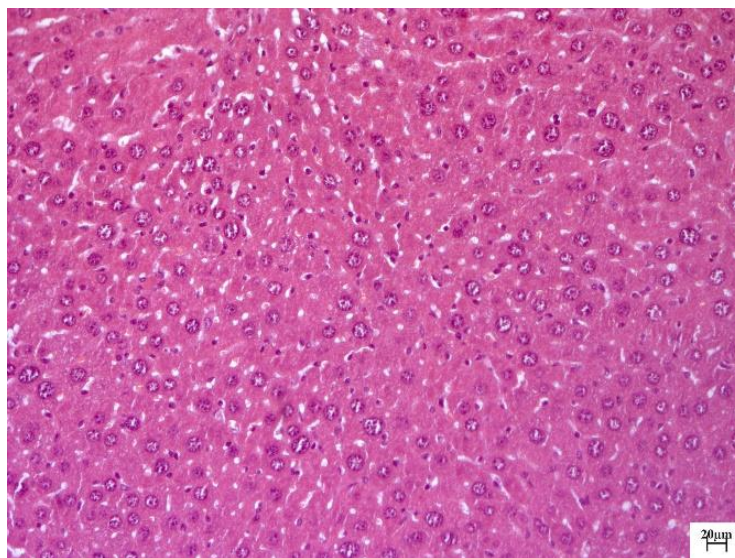


Рисунок 37 - Микрофотография печени мышей, которым вводили CCl_4 и QS-528 в дозе 120 мг/кг. Отсутствие гетерогенности гепатоцитов и жировой дистрофии свидетельствует о нормализации репаративных процессов. Окраска гематоксилин – эозин. Ув. $\times 200$

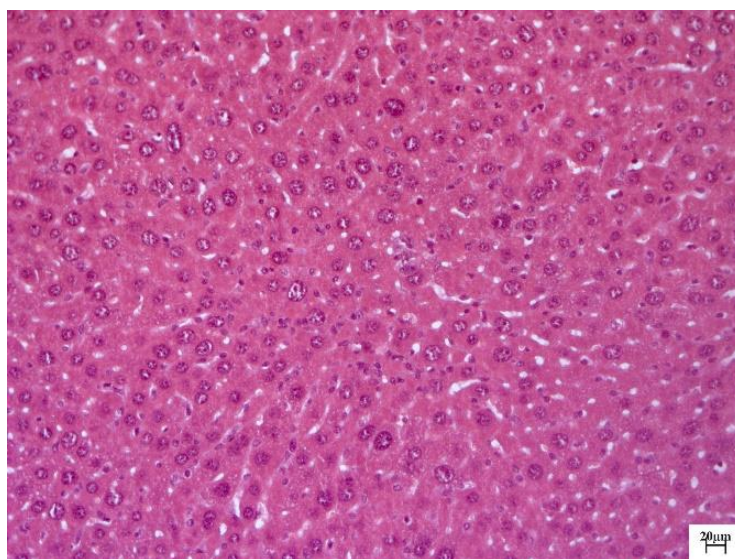


Рисунок 38 - Микрофотография печени мышей, которым вводили CCl_4 и QS-528 в дозе 150 мг/кг. Улучшение структуры гепатоцитов, отсутствие гетерогенности, дистрофии. Окраска гематоксилин – эозин. Ув. $\times 200$

Исходя из данных гистологического исследования печени можно сделать вывод о том, что введение QS-528 в дозах 120 и 150 мг/кг оказало более выраженное положительное влияние на состояние печени вследствие значительного снижения количества некрозов и мелкоvesикулярной жировой дистрофии гепатоцитов.

3.7.3 Морфометрическое исследование печени

Как и в ранее проведенном исследовании соединений QS-528 и QS-619 на генетической модели СД2, в данном эксперименте была рассчитана объемная плотность гепатоцитов, синусоидов и некрозов печени. Гепатопротекторное действие соединения тем лучше, чем больше объемная плотность гепатоцитов, синусоидов, и меньше плотность некрозов печени.

По результатам морфометрического исследования было обнаружено, что длительное введение 0,5% раствора CCl_4 не оказывает отрицательного влияния на объемную плотность гепатоцитов во всех исследуемых группах (рисунок 39).

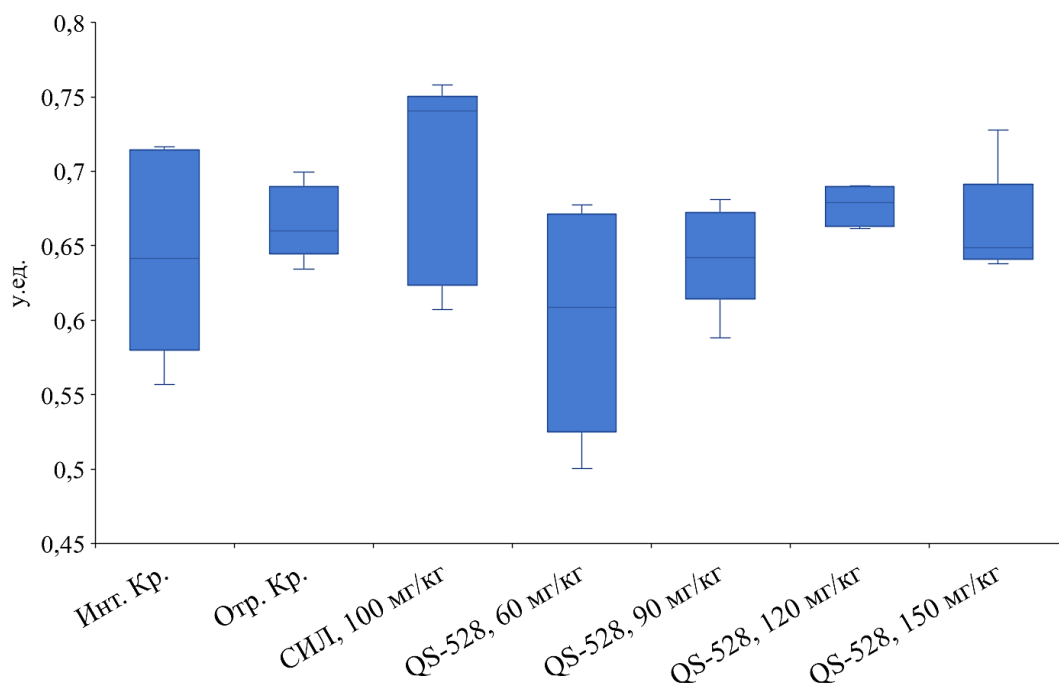


Рисунок 39 – Результаты морфометрического анализа печени (объемная плотность гепатоцитов) ($M \pm q$) ($n=9$ в каждой группе)

Примечание: У.ед.: условные единицы; Инт.Кр.: интактный контроль; Отр. Кр.: отрицательный контроль; СИЛ: силимарин.

Объемная плотность синусоидов печени после введения силимарина оставалась на уровне отрицательного контроля вследствие сохранения процессов фиброзирования, распространяющихся преимущественно перисинусоидально (рисунок 40). В экспериментальных группах, напротив, наблюдалось увеличение объемной плотности синусоидов печени вследствие разрешения мелкоvesикулярной липидной дистрофии и, как следствие, уменьшения сдавления просвета синусоидов (рисунок 40).

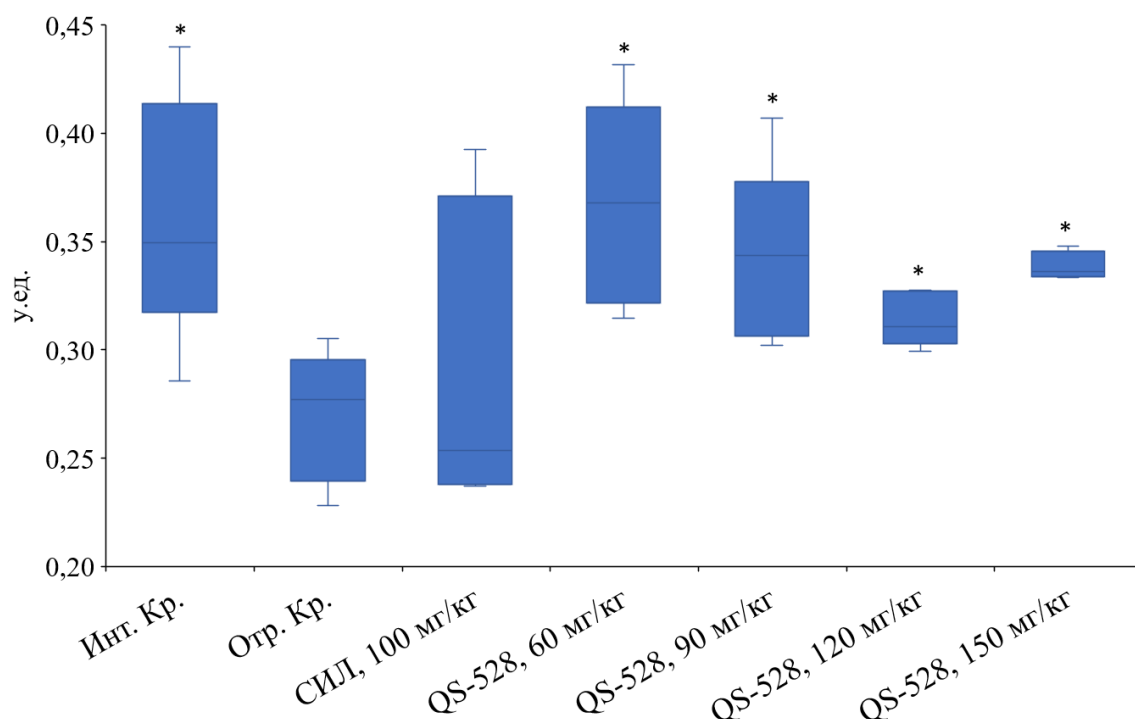


Рисунок 40 – Результаты морфометрического анализа печени (объемная плотность синусоидов печени) ($M \pm qr$) ($n=9$ в каждой группе)

Примечание: * $p \leq 0,05$ по сравнению с отрицательным контролем. У.ед.: условные единицы; Инт.Кр.: интактный контроль; Отр. Кр.: отрицательный контроль; СИЛ: силимарин.

Одним из основных показателей наличия у соединения гепатопротекторного действия при токсическом поражении печени является уменьшение объемной плотности некрозов, что можно наблюдать при введении силимарина в дозе 100 мг/кг и QS-528 во всех исследуемых дозах (рисунок 41).

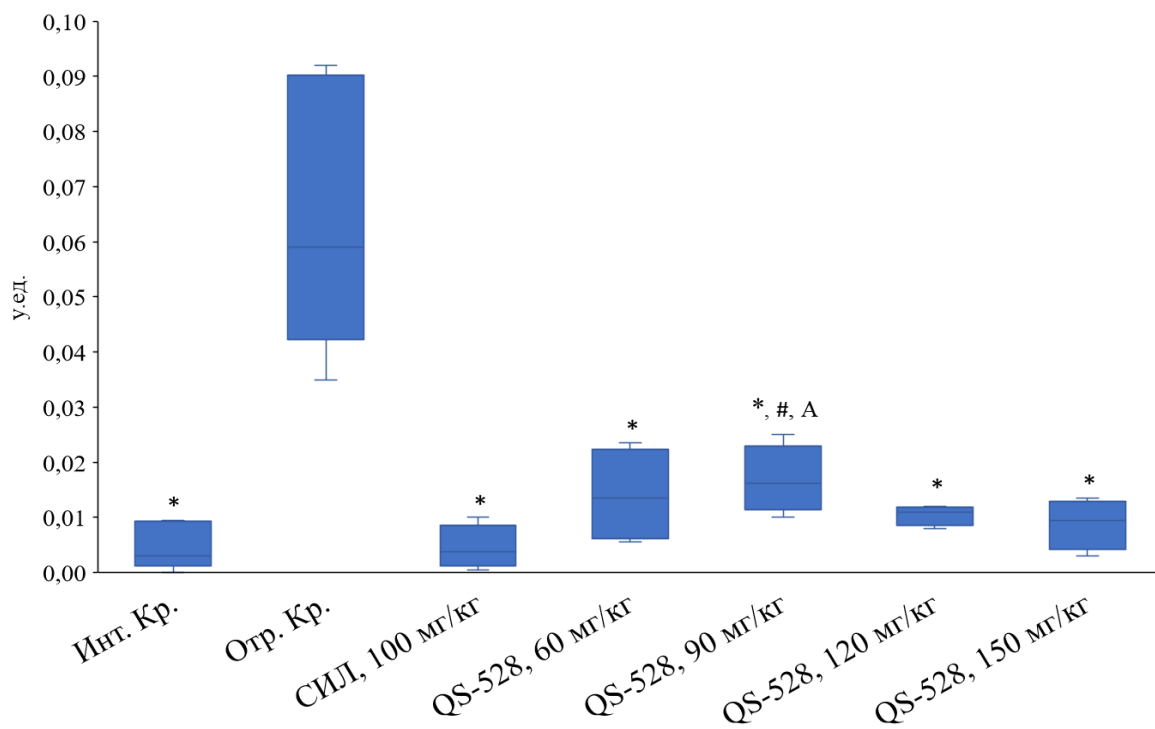


Рисунок 41 – Результаты морфометрического анализа печени (объемная плотность некрозов печени) ($M \pm qr$) ($n=9$ в каждой группе).

Примечание: * $p \leq 0,05$ по сравнению с отрицательным контролем; # $p \leq 0,05$ по сравнению с интактным контролем; ^A $p \leq 0,05$ по сравнению с силимарином 100 мг/кг. У.ед.: условные единицы; Инт.Кр.: интактный контроль; Отр. Кр.: отрицательный контроль; СИЛ: силимарин.

По результатам проведенных исследований на CCl_4 – индуцированной модели гепатотоксичности было обнаружено, что введение QS-528 на протяжении трех недель мышам CDI вызывало дозозависимое улучшение состояния печени. Это можно наблюдать по данным биохимического (таблица 10), гистологического (рисунок 35-38) и морфометрического исследования (рисунок 41). Более выраженное гепатопротекторное действие наблюдалось в дозе 120 и 150 мг/кг, о чем свидетельствует увеличение репаративной регенерации гепатоцитов, уменьшение стеатоза и некроза печени (рисунок 37, 38), а также снижение АЛТ (таблица 10). Подобный гепатопротекторный эффект наблюдался и в группе положительного контроля, следовательно, можно утверждать, что QS-528 в дозе 120 и 150 мг/кг не уступает эталонному гепатопротектору силимарину в дозе 100 мг/кг.

Обычно, эффективность гепатопротекторных препаратов обусловлена либо восстановлением нормальной физиологии печени, либо снижением вредного действия, вызванного гепатотоксическими агентами (Verma V.K. et al., 2013). Поскольку было показано, что соединение QS-528 является агонистом FFAR1, можно предположить, что оно, подобно полному агонисту FFAR1 – SCO-267, устраняет жировую дистрофию печени за счет снижения уровня окислительного стресса, вызванного свободными радикалами, образующимися при метаболизме CCl_4 (Ookawara M. et al., 2020). Такой механизм действия, по-видимому, является универсальным для многих гепатопротекторных соединений, в том числе он наблюдается у положительного контроля – силимарина. Его действие связано с увеличением уровня глутатиона в печени, который обычно обуславливает антиоксидантную защиту (Vargas-Mendoza N. et al., 2014). Кроме того, возможно, что гепатопротекторный эффект QS-528 на данной модели гепатотоксичности связан также со способностью агонистов FFAR1 препятствовать развитию CCl_4 – индуцированного фиброза печени посредством регуляции макрофагов, фибробластов/миофибробластов и эпителиальных клеток (Gagnon L. et al., 2018). Также был предложен еще один механизм гепатопротекторного действия агонистов FFAR1, согласно которому они восстанавливают нормальное состояние печени посредством стимуляции сигнального пути AMPK (Li M. et al., 2016; Li M.H. et al., 2019), чем также может быть обусловлено восстановление нормального состояния печени соединением QS-528.

Таким образом, изучение QS-528 на CCl_4 – индуцированной модели повреждения печени показало, что оно может оказывать гепатопротекторное действие не только при метаболическом повреждении печени, но и при токсическом поражении тетрахлорметаном.

3.8 Изучение соединений QS-528 и QS-619 на клетках линии HepG2

В данной работе мы исследовали способность QS-528 и QS-619 непосредственно воздействовать на клетки печени, оценивая жизнеспособность, потребление глюкозы и высвобождение лактата клетками HepG2. Клеточная линия HepG2 была получена из биоптатов печени 15-летнего мужчины европеоидной расы с дифференцированной гепатоцеллюлярной карциномой. Эта линия клеток чаще всего используется в различных фармакотоксикологических исследованиях, поскольку сохраняет морфологию и многие функции печени в культуре, такие как синтез и секреция белков плазмы, метаболизм холестерина и ТГ, метаболизм и транспорт липопротеинов, синтез желчных кислот, гликогена или передача сигналов инсулина (Donato M.T. et al., 2015).

В условиях гипергликемии у клеток линии HepG2 снижается поглощение глюкозы в связи с нарушением передачи сигналов инсулина. В условиях высокого содержания уровня глюкозы образуются активные формы кислорода, которые накапливаются в клетках HepG2 и индуцируют окислительный стресс, активирующий PKC и JNK. Это приводит к фосфорилированию серина IRS-1, а не тирозина, что способствует ингибированию связывания IRS-1 с рецептором инсулина (IR) (Cordero-Herrera I. et al., 2014). Соответственно, блокируется сигнальный путь PI3K/AKT, в результате чего инактивируется белок-переносчик глюкозы-2 и снижается поглощения глюкозы клетками (Cordero-Herrera I. et al., 2014; Liang G. et al., 2016). В нашей работе было обнаружено сниженное потребление глюкозы клетками HepG2 в контрольной группе, что, вероятно, происходит по описанному выше механизму. При добавлении соединения QS-528 наблюдалось дозозависимое повышение потребления глюкозы клетками во всем диапазоне концентраций. Соединение QS-619 повышало процент потребления глюкозы только в концентрациях 2,5 – 10 μM , однако этот эффект был более выражен, чем у соединения QS-528. В более высокой концентрации QS-619 (25 μM) процент поглощения глюкозы клетками снижался, тем не менее оставаясь выше степени поглощения глюкозы в контрольной группе (таблица 11). Чем обусловлено повышение поглощения глюкозы клетками HepG2 в условиях гипергликемии при

добавлении QS-528 и QS-619 до конца не ясно. Опираясь на литературные данные, можно предположить, что это связано со снижением активации PKC/JNK и повышением активности AMPK, что приводит к блокированию фосфорилирования серинового остатка IRS-1 и поглощению глюкозы клетками HepG2 за счет улучшения инсулинорезистентности (Lin C.L., Lin J.K., 2008).

Параллельно мы оценивали способность клеток HepG2 в условиях повышенного содержания глюкозы высвобождать лактат при добавлении QS-528 и QS-619. В клетках происходит аэробное или анаэробное окисление глюкозы, сопровождающееся запасанием энергии в виде молекул АТФ. Аэробное окисление происходит в митохондриях и протекает при участии кислорода, тогда как анаэробное окисление (гликолиз) происходит вне митохондрий без участия кислорода, в результате чего образуется пировиноградная кислота, которая восстанавливается до молочной кислоты (лактата) (Yin J. et al., 2008). Гликолиз модулируется набором ферментов и факторов, в том числе AMPK посредством активации фосфофруктокиназы (PFK), критического фермента клеточного гликолиза (Ren G. et al., 2020). Соответственно, повышение активности AMPK стимулирует не только поглощение глюкозы клетками, но и высвобождение лактата за счет усиления гликолиза. Исследуя способность клеток HepG2 высвобождать лактата при инкубации с QS-528 и QS-619, мы обнаружили, что оба соединения дозозависимо повышают процент высвобождения лактата, по сравнению с контрольной группой (таблица 11), что может быть связано с повышением активности AMPK и стимуляцией гликолиза.

Метформин также повышал потребление глюкозы клетками HepG2 и высвобождение лактата, но в значительно более высоких концентрациях (mM). Поскольку он является известным активатором AMPK (Ren G. et al., 2020), то наблюдаемые нами эффекты при добавлении его в культуру клеток HepG2 связаны соответственно с ингибированием фосфорилирования серинового остатка IRS-1 и улучшения инсулинорезистентности и усилением гликолиза, посредством активации PFK.

В данном эксперименте мы в том числе оценивали и цитотоксические свойства изучаемых веществ. Одним из наиболее часто используемых анализов для определения цитотоксичности является МТТ. Это чувствительный, количественный и надежный колориметрический анализ, который позволяет измерять жизнеспособность, пролиферацию и активацию клеток. Он основан на способности ферментов митохондриальной дегидрогеназы в живых клетках превращать желтый водорастворимый субстрат – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) путем расщепления тетразолиевого кольца в темно-синий формазан, нерастворимый в воде. Этот формазановый продукт пропорционален количеству жизнеспособных клеток и обратно пропорционален степени цитотоксичности (Senthilraja P., Kathiresan K., 2015). По результату МТТ анализа было установлено, что инкубация клеток линии НерG2 с соединениями QS-528 и QS-619 повышает выживаемость клеток, причем больший процент жизнеспособных клеток наблюдался в низких концентрациях (2,5 и 5 μM) (таблица 11). При добавлении метформина к клеткам линии НерG2 выживаемость клеток оставалась на уровне контрольной группы.

Таким образом, в эксперименте было установлено, что соединение QS-528 в низких концентрациях (2,5 и 5 μM) незначительно увеличивало потребление глюкозы и высвобождение лактата, но значительно увеличивал количество клеток (таблица 11). В более высоких концентрациях (10-25 μM) оно стимулировало большее поглощение глюкозы клетками, однако их выживаемость снижалась до уровня контрольной группы. В отличие от QS-528 инкубация с QS-619 в концентрациях 2,5 – 10 μM значительно повышала потребление глюкозы и высвобождение лактата в клетках (таблица 11). Также было отмечено повышение выживаемость клеток в концентрациях 2,5 и 5 μM , которая, однако, снижалась до уровня контрольной группы в концентрации 10 μM (таблица 11). В более высокой концентрации (25 μM) соединение QS-619 снижало потребление глюкозы в клетках, что, вероятно, связано с уменьшением их количества (таблица 11). Метформин, стимулятор АМРК, увеличивал потребление глюкозы и высвобождение лактата в клетках НерG2 при значительно более высоких

концентрациях (mM), не влияя на количество клеток (таблица 11), что свидетельствует о том, что повышение жизнеспособности клеток при инкубации с QS-528 и QS-619 не является следствием стимуляции потребления клетками глюкозы.

Таблица 11 – Влияние соединений QS-528 и QS-619 на клетки линии HepG2 (S±m)

	Потребление глюкозы, %	Высвобождение лактата, %	Выживаемость клеток, %
Контрольная группа	24,98±1,68	15,03±0,59	100,00±3,07
Метформин			
1 mM	48,52±2,87 ***	30,03±3,04 ***	101,51±1,90
2,5 mM	62,32±0,72 ***	46,08±3,20 ***	91,11±3,40
QS-528			
2,5 μM	39,80±2,75 **	25,58±1,35 ***	146,31±6,16 ***
5 μM	37,79±4,46 **	27,65±1,15 ***	135,77±4,19 ***
10 μM	44,91±3,00 ***	42,62±1,20 ***	114,54±3,95
25 μM	85,52±1,99 ***	61,61±0,49 ***	109,57±2,67
QS-619			
2,5 μM	49,18±1,76 ***	35,78±2,68 ***	139,89±4,62 ***
5 μM	72,93±0,82 ***	52,36±0,23 ***	121,02±2,45 **
10 μM	98,58±0,61 ***	61,74±0,81 ***	99,68±3,87
25 μM	64,14±3,77 ***	59,97±1,57 ***	36,10±3,39 ***

Примечание: ** p<0,01, *** p<0,001 по сравнению с контрольной группой.

Исходя из полученных результатов можно сделать вывод о том, что QS-528 и QS-619 оказывают разное действие на клетках линии HepG2. Соединение QS-528 оказывает большее влияние на выживаемость клеток, тогда как QS-619 на потребление клетками глюкозы и высвобождение лактата. Эти данные подтверждают гепатопротекторное действие соединения QS-528 в различных животных моделях, использованных нами и гипогликемическое действие соединения QS-619 на генетической и диет-индуцированных моделях СД2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наиболее распространенным метаболическим заболеванием в мире является СД2, характеризующейся развитием гипергликемии, возникающей в результате снижения чувствительности периферических тканей к инсулину (инсулинорезистентность) и/или неспособности инсулин-секретируемых β -клеток ПЖ компенсировать это состояние (Faselis C. et al., 2019; Viigimaa M. et al., 2019). Несмотря на большое количество гипогликемических препаратов с различным механизмом действия зачастую сложно добиться оптимального контроля гликемии, особенно у коморбидных пациентов, в связи с наличием у этих препаратов побочных эффектов и противопоказаний к использованию (Аляутдин Р.Н., 2020). Следовательно, необходимо улучшение лекарственной терапии СД2 за счет поиска новых противодиабетических средств, в том числе влияющих на новые молекулярные мишени.

К таким многообещающим и перспективным мишеням относится FFAR1, который экспрессируется на β -клетках ПЖ и энтероэндокринных клетках кишечника (Chen C. et al., 2016). Его активация приводит к стимуляции секреции инсулина β -клетками ПЖ и инкретинов – GLP-1 и GIP, которые связываются с соответствующими рецепторами на β -клетках и усиливают высвобождение инсулина. Стоит отметить, что агонисты FFAR1 стимулируют секрецию инсулина глюкозозависимым образом, что снижает риск гипогликемии (Governi P. et al., 2021; Li Z., 2018). Различают частичные и полные агонисты FFAR1: частичные агонисты, например, TAK-875, связываются только с рецепторами на β -клетках ПЖ, тогда как полные агонисты, например AM-1638, активируют рецепторы как на β , так и энтероэндокринных клетках, что приводит к повышению их эффекта (Li Z. et al., 2020; Mach M. et al., 2021). На данный момент, нет агонистов FFAR1, которые бы использовались в клинической практике. Многие из них проходят доклинические исследования, некоторые достигли стадии клинических испытаний, но их дальнейшее исследование было прекращено в связи с гепатотоксичностью (Li Z. et al., 2020). Разработка нового эффективного и безопасного агониста FFAR1

позволит создать еще один класс гипогликемических препаратов с инсулин-зависимым механизмом действия.

За последнее время было разработано множество агонистов FFAR1. К таким соединениям относится QS-528, поскольку было обнаружено, что оно проявляет гипогликемическую активность, а также активирует FFAR1 (Kuranov S.O. et al., 2020). Исходя из этого были синтезированы его новые структурные аналоги, являющиеся потенциальными агонистами FFAR1, которые и были изучены в настоящей работе. Кроме того, само соединение QS-528 было подвергнуто более детальному фармакологическому исследованию. В результате проведенных экспериментов противодиабетический эффект был обнаружен у соединения QS-619 на моделях генетически обусловленного и диет-индуцированного СД2. Изучение QS-528 позволило выявить его гепатопротекторный эффект на различных экспериментальных моделях.

Гипогликемическое действие соединения QS-619, содержащего О-эндоборнильный фрагмент, было обнаружено по результату скрининга, проведенного в дозе 10 мг/кг среди структурных аналогов соединения QS-528. Обнаруженный эффект носил дозозависимый характер, поскольку в дозе 5 мг/кг гипогликемический эффект отсутствовал, доза 10 мг/кг являлась минимальной дозой, при которой появлялось гипогликемическое действие, а при увеличении дозы до 30 мг/кг этот эффект был наиболее выраженным. В связи с этим доза 30 мг/кг была выбрана для дальнейших исследований QS-619 и QS-528 на животных моделях СД2, а именно на генетически обусловленной (Derkach K.V. et al., 2017; Klebig M.L. et al., 1995) и диет-индуцированной модели (Petro A.E. et al., 2004; Surwit R.S. et al., 1988).

Первоначально было проведено изучение противодиабетического действия QS-528 и QS-619 на генетической модели СД2, а именно на мышах линии C57Bl/6J A^y/_a, для которых характерно наличие ожирения, гиперинсулинемии и нарушенной толерантности к глюкозе (Carroll L. et al., 2004; Voisey J., van Daal A., 2002). По окончании 2-х недель введения исследуемых соединений гипогликемическое действие было установлено у соединения QS-619, тогда как QS-528 искомой

активности не проявило, однако оно разрешало жировую дистрофию печени мышей и улучшало липидный обмен. При изучении противодиабетического действия QS-528 и QS-619 на диет-индуцированной модели СД2 (мыши линии C57Bl/6J) нами были подтверждены результаты, полученные на мышах C57Bl/6J A^{y/a}. Было показано, что соединение QS-619 по окончании 4-х недель введения мышам C57Bl/6J проявляет гипогликемическое действие, а QS-528 улучшает состояние печени в виде уменьшения жирового гепатоза.

Следующем этапом работы было изучение механизма действия соединения QS-619, а именно оценка его способности активировать FFAR1, поскольку известно, что QS-528 является агонистом данного рецептора (Kuranov S.O. et al., 2020). Было установлено, что QS-619 активирует FFAR1 в концентрации 10 μ M аналогично эталонному агонисту GW9508 и соединению QS-528. Так как соединения QS-528 и QS-619 являются агонистами FFAR1 и должны стимулировать секрецию инсулина глюкозо-зависимым способом (Governa P. et al., 2021; Li Z. et al., 2018), мы определяли концентрацию этого гормона в крови мышей после однократного введения этих соединений. Было показано, что оба соединения в дозе 30 мг/кг стимулируют секрецию инсулина, не уступая положительному контролю – вилдаглиптину. Помимо стимуляции секреции инсулина, агонисты FFAR1 способствуют секреции инкретинов энтероэндокринными клетками кишечника (Governa P. et al., 2021; Li Z. et al., 2018). Исходя из этого, мы исследовали способность наших соединений повышать концентрацию GIP в крови мышей. Было обнаружено, что однократное введение QS-528 и QS-619 повышает концентрацию GIP в плазме крови, что подтверждает их предполагаемый механизм действия. В связи с тем, что соединения QS-528 и QS-619 стимулируют секрецию инсулина и GIP мы предполагаем, что они являются полными агонистами FFAR1 и, вероятно, связываются как с FFAR1 на β -клетках ПЖ, так и энтероэндокринных клетках кишечника, что требует дальнейшего уточнения в исследованиях *in vitro*.

По ходу работы стало очевидно, что QS-528 проявляет гепатопротекторный эффект в животных моделях СД2. Поэтому мы решили выяснить, распространяется ли такой эффект на токсическое повреждение печени. Для это мы провели

эксперимент на модифицированной модели CCl_4 – индуцированной гепатотоксичности (Kojima-Yuasa A. et al., 2016). Соединение QS-528 вводили *per os* мышам CDI в дозах от 60 до 150 мг/кг в течение 3-х недель. По окончании эксперимента было обнаружено снижение концентрации печеночных ферментов в крови мышей и улучшение состояния печени в виде уменьшения степени выраженности дистрофических изменений гепатоцитов и количества некрозов. Причем наиболее выраженные признаки нормализации состояния печени наблюдались в дозах 120 и 150 мг/кг. Следовательно, можно сделать вывод о том, что QS-528 проявляет гепатопротекторное действие как при метболическом повреждении печени, так и при ее токсическом поражении тетрахлорметаном. Обнаружение гепатопротекторного действия у нового агониста FFAR1 очень ценно, поскольку в литературе сообщается об очень малом количестве агонистов FFAR1, обладающих этим эффектом. Механизм гепатопротекторного действия новых агонистов FFAR1, в частности соединения QS-528, до конца не известен и требует более детального изучения в будущем.

Одним из важных параметров потенциальных лекарственных средств является показатель острой токсичности, которую мы определяли у соединений QS-528 и QS-619. Для этого их вводили однократно в дозе 1000 мг/кг мышам CDI. По окончании эксперименты мы не обнаружили гибели животных, изменение их внешнего вида и поведения, что свидетельствует об отсутствии токсичного действия соединений QS-528 и QS-619 в дозе 1000 мг/кг и позволяет предположить, что их LD_{50} значительно выше этой дозы.

Кроме определения острой токсичности *in vivo* мы оценивали цитотоксичность соединений QS-528 и QS-619 на клеточной линии HepG2, а также изучали способность этих соединений влиять на потребление глюкозы клетками HepG2 и высвобождение ими лактата. Исходя из полученных результатов был сделан вывод о том, что соединение QS-528 оказывает большее влияние на выживаемость клеток, тогда как QS-619 на потребление клетками глюкозы. Соответственно, это подтверждает гепатопротекторное действие соединения QS-528 и гипогликемическое действие соединения QS-619.

По результатам проведенных исследований можно сделать вывод о том, что соединение под шифром QS-619 обладает гипогликемическим действием и является новым агонистом FFAR1. Соединение QS-528 не проявляет гипогликемического действия в животных моделях СД2, однако оно обладает гепатопротекторным действием. Таким образом, в ходе данного диссертационного исследования мы выполнили все поставленные перед нами задачи и достигли поставленной цели. На основе полученных нами результатов возможна дальнейшая разработка и создание новых агонистов FFAR1, обладающих как гипогликемическим, так и гепатопротекторным действием, которые в будущем будут использоваться для лечения СД2 и НАЖБП, соответственно.

ВЫВОДЫ

1. По результату скрининга новых структурных аналогов хлорида (1R,2R,4R)-N-(4-((4-(2-карбоксиэтил) фенокси) метил) бензил)-1,7,7-триметилбицикло [2.2.1] гептан-2-аммония (QS-528) в дозе 10 мг/кг достоверный гипогликемический эффект был обнаружен у (3-(4-(4-(((1S,2R,4S)-1,7,7-триметилбицикло [2.2.1] гептан-2-илокси) метил) бензилокси) фенил) пропановой кислоты) (QS-619). Гипогликемический эффект QS-619 усиливался при увеличении дозы до 30 мг/кг.

2. Обнаружено, что QS-619 в дозе 30 мг/кг проявляет достоверный гипогликемический эффект на генетической и диет-индуцированной модели СД2, тогда как QS-528 в аналогичных экспериментах показало гепатопротекторное действие.

3. В исследованиях *in vitro* было установлено, что соединения QS-528 и QS-619 являются агонистами FFAR1 и стимулируют секрецию инсулина и GIP.

4. Установлено, что соединение QS-528 в дозах 120 и 150 мг/кг проявляет гепатопротекторное действие в модели CCl₄– индуцированной гепатотоксичности.

5. В исследовании на клетках линии HepG2 было обнаружено, что QS-528 увеличивает выживаемость клеток, тогда как QS-619 в большей степени повышает потребление глюкозы и высвобождение лактата, при этом не влияя на жизнеспособность клеток.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АЛТ – аланинаминотрансфераза
- АСТ – аспартатаминотрансфераза
- ДКМП - диабетическая кардиомиопатия
- ИБС - ишемическая болезнь сердца
- КИ – клинические испытания
- ЛПВП - липопротеиды высокой плотности
- ЛПНП - липопротеидов низкой плотности
- НАЖБП – неалкогольная жировая болезнь печени
- НАСГ – неалкогольный стеатогепатит
- ОГТТ - оральный глюкозотолерантный тест
- ПЖ - поджелудочная железа
- СВН - сердечная вегетативная невропатия
- СД2 – сахарный диабет 2 типа
- ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
- ССО – сердечно-сосудистыми осложнения
- ТГ – триглицериды
- ФПК – фенилпропановая кислота
- ЦВЗ - цереброваскулярные заболевания
- ЩФ - щелочная фосфатаза
- АСС - ацетилкоэнзим-А карбоксилаза
- АКТ - протеинкиназа В
- АМРК - аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа
- AUC - площадь под гликемической кривой
- CRTC2 – цАМФ-чувствительный элемент-связывающий белок 1 –
регулируемый коактиватором транскрипции 2
- DHA - докозагексаеновая кислота
- DHAP – дигидроксиацетонфосфат
- DPP-4 – дипептидил-пептидаза-4

- ER - эндоплазматический ретикулум
- FAAs - свободные жирные кислоты
- FBP1 – фруктоза-1,6-бисфосфатаза
- FFAR1 – рецептор свободных жирных кислот-1
- G3P - глицерол-3-фосфат
- GDF15 - фактор роста/дифференцировки 15
- GFRAL – α -подобный рецептор семейства глиального нейротрофического фактора
- GIP – глюкозозависимый инсулиотропный полипептид
- GLP-1 – глюкагоноподобный пептид-1
- GLP-1R – рецептор глюкагоноподобного пептида-1
- GLUT4 - транспортер глюкозы 4
- GPD2 - глицерол-3-фосфатдегидрогеназа-2
- GSK-3 - киназа гликогенсинтазы-3
- HbA1c – гликированный гемоглобин
- HepG2 - клеточная линия гепатоцеллюлярной карциномы человека
- IAPP - островковый амилоидный полипептид
- IKK β – ядерный фактор каппа- β
- IP₃ – инозитолтрифосфат
- IRS - субстрат инсулинового рецептора
- JNK – терминальная киназа c-Jun
- LD₅₀ – среднесмертельная доза
- MC4R - меланокортиновый рецептор 4 типа
- MCP-1 – моноцитарный хемотоксический белок-1
- mTORC2 – мишень рапамицина млекопитающих-2
- p38 MAPK – протеинкиназа-p38
- per os* – пероральное введение
- PFK – фосфофруктокиназа
- PGC-1 α – коактиватор гамма-рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом-1 α

PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа

PKC – протеинкиназа C

PPAR - рецептор, активируемый пролифератором пероксисом

PTP1B – протеинтирозинфосфатазу 1B

RAPGEF4 - фактор обмена гуаниновых нуклеотидов Rap 4

ROS – активные формы кислорода

SERCA – АТФаза сарко/эндоплазматического ретикулума

SGLT - натрий-глюкозный ко-транспортер

TLR4 - толл-подобный рецептор-4

TNF- α – фактор некроза опухоли- α

TZD – тиазолидиндионы

UPR - развернутый белковый ответ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авантадилов, Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство / Г.Г. Авантадилов. – Москва: Медицина, 1990. – 384 с.
2. Аляутдин, Р.Н. Фармакология: учебник / Р.Н. Аляутдин. – 6-е изд., перераб. и доп. – Москва: ГОЭТАР-Медиа, 2020. – 1104 с.
3. Анциферов, М.Б. Система поддержки принятых врачами решений. Эндокринология: Клинические протоколы лечения / М.Б. Анциферов, О.В. Духарева, М.В. Шестакова, Е.А. Трошина, Г.Р. Галстян, В.С. Пронин, А.В. Андреева, Н.В. Маркина, О.М. Котешкова, Н. А. Демидов, Ю.В. Голубева, Е.А. Ермакова, Н.В. Иванова. – Москва: ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ», 2021 – 80 с.
4. ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности (с Изменениями N 1,2).
5. Колодова, И.М. Изменение в легких при сахарном диабете / И.М. Колодова, Л.В. Лысенко, Б.Б. Салтыков // Архив патологии. – 1982. – Т. 44. – № 7. – С. 35–40.
6. Лилли, Р.Д. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Р.Д. Лилли. – М.: Мир, 1969. – 646 с.
7. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А.Н. Миронов, Н.Д. Бунатян. – Москва: Гриф и К, 2012. – 944 с.
8. Общероссийская общественная организация "Российское научное медицинское общество терапевтов". Научное общество гастроэнтерологов России. Неалкогольная жировая болезнь печени у взрослых. Клинические рекомендации, 2022. – 95 с.
9. Abdelaziz, D.H.A. The protective effect of Phoenix dactylifera L. seeds against CCl₄-induced hepatotoxicity in rats / D.H.A. Abdelaziz, S.A. Ali // Journal of Ethnopharmacology. – 2014. – Vol. 155. – № 1. – P. 736–743.

10. Ahmed, B. Adipose tissue and insulin resistance in obese / B. Ahmed, R. Sultana, M.W. Greene // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. – 2021. – Vol. 137. – P. 111315.
11. Ahren, B. Mechanisms of action of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor vildagliptin in humans / B. Ahren, A. Schweizer, S. Dejager, E.B. Villhauer, B.E. Dunning, J.E. Foley // *Diabetes, Obesity and Metabolism*. – 2011. – Vol. 13. – № 9. – P. 775–783.
12. Alicic, R.Z. Diabetic kidney disease: Challenges, progress, and possibilities / R.Z. Alicic, M.T. Rooney, K.R. Tuttle // *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. – 2017. – Vol. 12. – № 12. – P. 2032–2045.
13. Baldini, G. The melanocortin pathway and control of appetite-progress and therapeutic implications / G. Baldini, K.D. Phelan // *Journal of Endocrinology*. – 2019. – Vol. 241. – № 1. – P. R1–R33.
14. Bazydlo-Guzenda, K. Evaluation of the hepatotoxicity of the novel GPR40 (FFAR1) agonist CPL207280 in the rat and monkey / K. Bazydlo-Guzenda, P. Buda, M. Mach, J. Pieczykolan, I. Kozłowska, M. Janiszewski, E. Drzazga, J. Dominowski, H. Ziolkowski, M. Wieczorek, S.C. Gad // *PLoS One*. – 2021. – Vol. 16. – № 9. – P. e0257477.
15. Bellavite, P. A Descriptive Review of the Action Mechanisms of Berberine, Quercetin and Silymarin on Insulin Resistance/Hyperinsulinemia and Cardiovascular Prevention / P. Bellavite, S. Fazio, F. Affuso // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28. – № 11. – P. 4491.
16. Blonde, L. American Association of Clinical Endocrinology Clinical Practice Guideline: Developing a Diabetes Mellitus Comprehensive Care Plan-2022 Update / L. Blonde, G.E. Umpierrez, S.S. Reddy, J.B. McGill, S.L. Berga, M. Bush, S. Chandrasekaran, R.A. DeFronzo, D. Einhorn, R.J. Galindo, T.W. Gardner, R. Garg, W.T. Garvey, I.B. Hirsch, D.L. Hurley, K. Izuora, M. Kosiborod, D. Olson, S.B. Patel, R. Pop-Busui, A.R. Sadhu, S.L. Samson, C. Stec, W.V. Jr Tamborlane, K.R. Tuttle, C. Twining, A. Vella, P. Vellanki, S.L. Weber // *Endocrine Practice*. – 2022. – Vol. 28. – № 10. – P. 923–1049.

17. Burant, C.F. Activation of GPR40 as a therapeutic target for the treatment of type 2 diabetes / C.F. Burant // *Diabetes Care*. – 2013. – Vol. 36. – P. S175–S179.
18. Burkey, B. F. Acute and chronic effects of the incretin enhancer vildagliptin in insulin-resistant rats / B. F. Burkey, X. Li, L. Bolognese, M. Mone, M. Russell, T.E. Hughes, P.R. Wang // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2005. – Vol. 315. – № 2. – P. 688–695.
19. Byrne, C.D. NAFLD: A multisystem disease / C.D. Byrne, G. Targher // *Journal of Hepatology*. – 2015. – Vol. 62. – P. S47–S64.
20. Carroll, L. Mouse models of obesity / L. Carroll, J. Voisey, A. van Daal // *Clinical Dermatology*. – 2004. – Vol. 22. – № 4. – P. 345–349.
21. Carter, A. Intimal neovascularisation is a prominent feature of atherosclerotic plaques in diabetic patients with critical limb ischaemia / A. Carter, M. O. Murphy, N. J. Turner, A.T. Halka, J. Ghosh, F. Serracino-Inglott, M.G. Walker, F. Syed // *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. – 2007. – Vol. 33. – № 3. – P. 319–324.
22. Chen, C. GPR40 agonists for the treatment of type 2 diabetes mellitus: The biological characteristics and the chemical space / C. Chen, H. Li, Y.Q. Long // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2016. – Vol. 26. – № 23. – P. 5603–5612.
23. Christensen, A.A. Beta Cell in Type 2 Diabetes / A.A. Christensen, M. Gannon // *Current Diabetes Reports*. – 2019. – Vol. 19. – № 81. – P. 1–8.
24. Chueire, V.B. Effect of free fatty acids on insulin secretion, insulin sensitivity and incretin effect – a narrative review / V.B. Chueire, E. Muscelli // *Archives of Endocrinology and Metabolism*. – 2021. – Vol. 65. – № 1. – P. 24–31.
25. Classification of diabetes mellitus. – Geneva: World Health Organization. – 2019. – P. 40. – ISBN 978-92-4-151570-2
26. Cole, J.B. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications / J.B. Cole, J.C. Florez // *Nature Reviews Nephrology*. – 2020. – Vol. 16. – № 7. – P. 377–390.
27. Cordero-Herrera, I. Cocoa flavonoids attenuate high glucose-induced insulin signalling blockade and modulate glucose uptake and production in human HepG2 cells / I. Cordero-Herrera, M.A. Martin, L. Goya, S. Ramos // *Food and Chemical Toxicology*. – 2014. – Vol. 64. – P. 10–19.

28. Dai, N. Antioxidant properties of proanthocyanidins attenuate carbon tetrachloride (CCl₄)-induced steatosis and liver injury in rats via CYP2E1 regulation / N. Dai, Y. Zou, L. Zhu, H.F. Wang, M.G. Dai // *Journal of Medicinal Food*. – 2014. – Vol. 17. – № 6. – P. 663–669.
29. Deacon, C.F. Dipeptidyl peptidase 4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes mellitus / C.F. Deacon // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2020. – Vol. 16, № 11. – P. 642–653.
30. DeForest, N. Genetics of Type 2 Diabetes: Implications from Large-Scale Studies / N. DeForest, A.R. Majithia // *Current Diabetes Reports*. – 2022. – Vol. 22. – № 5. – P. 227–235.
31. DeFronzo, R. Metformin-associated lactic acidosis: Current perspectives on causes and risk / R. DeFronzo, G.A. Fleming, K. Chen, T.A. Bicsak // *Metabolism*. – 2016. – Vol. 65. – № 2. – P. 20–29.
32. Delgado-Montemayor, C. Models of hepatoprotective activity assessment / C. Delgado-Montemayor, P. Cordero-Perez, R. Salazar-Aranda, N. Waksman-Minsky // *Medicina Universitaria*. – 2015. – Vol. 17. – № 69. – P. 222–228.
33. Demir, S. Emerging Targets in Type 2 Diabetes and Diabetic Complications / S. Demir, P.P. Nawroth, S. Herzig, B. Ekim Üstünel // *Advanced Science*. – 2021. – Vol. 8. – № 18. – P. 2100275.
34. Derkach, K.V. Metabolic parameters and functional state of hypothalamic signaling systems in AY/a mice with genetic predisposition to obesity and the effect of metformin / K.V. Derkach, I.O. Zakharova, I.V. Romanova, I.I. Zorina, A.L. Mikhrina, A.O. Shpakov // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2017. – Vol. 477. – № 1. – P. 377–381.
35. Donato, M.T. Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells / M.T. Donato, L. Tolosa, M.J. Gomez-Lechon // *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*. – 2015. – Vol. 1250. – P. 77–93.
36. Duan, W. Hyperglycemia, a neglected factor during cancer progression / W. Duan, X. Shen, J. Lei, Q. Xu, Y. Yu, R. Li, E. Wu, Q. Ma // *BioMed Research International*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 461917.

37. Edfalk, S. Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion / S. Edfalk, P. Steneberg, H. Edlund // *Diabetes*. – 2008. – Vol. 57. – № 9. – P. 2280–2287.
38. Eggleton, J.S. Thiazolidinediones / J.S. Eggleton, I. Jialal // *StatPearls*. - Treasure Island: StatPearls Publishing, 2020. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551656/>.
39. Einarson, T.R. Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: A systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007-2017 / T.R. Einarson, A. Acs, C. Ludwig, U.H. Panton // *Cardiovascular Diabetology*. – 2018. – Vol. 17. – № 1. – P. 83.
40. El, K. The role of GIP in α -cells and glucagon secretion / K. El, J.E. Campbell // *Peptides*. – 2020. – Vol. 125. – P. 170213.
41. Engin, A. Adiponectin-resistance in obesity / A. Engin // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2017. – Vol. 960. – P. 415–441.
42. Faselis, C. Microvascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus / C. Faselis, A. Katsimardou, K. Imprialos, P. Deligkaris, M. Kallistratos, K. Dimitriadis // *Current Vascular Pharmacology*. – 2019. – Vol. 18. – № 2. – P. 117–124.
43. Feldman, E.L. Diabetic neuropathy / E. L. Feldman, B. C. Callaghan, R. Pop-Busui, D.W. Zochodne, D.E. Wright, D.L. Bennett, V. Bril, J.W. Russell, V. Viswanathan // *Nature Reviews Disease Primers*. – 2019. – Vol. 5. – № 1. – P. 42–81.
44. Filippatos, T.D. Adverse Effects of GLP-1 Receptor Agonists / T.D. Filippatos, T.V. Panagiotopoulou, M.S. Elisaf // *The Review of Diabetic Studies*. – 2014. – Vol. 11. – № 3–4. – P. 202–230.
45. Forouhi, N.G. Epidemiology of diabetes / N.G. Forouhi, N.J. Wareham // *Medicine*. – 2022. – Vol. 50. – № 10. – P. 638–643.
46. Freeman, R. Diabetic autonomic neuropathy / R. Freeman // *Handbook of Clinical Neurology*. – 2014. – Vol. 126. – P. 63–79.
47. Friedman, S.L. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies / S.L. Friedman, B.A. Neuschwander-Tetri, M. Rinella, A.J. Sanyal // *Nature Medicine*. – 2018. – Vol. 24. – № 7. – P. 908–922.

48. Fung, T.H. Diabetic retinopathy for the non-ophthalmologist / T.H. Fung, B. Patel, E.G. Wilmot, W.M. Amoaku // *Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London*. – 2022. – Vol. 22. – № 2. – P. 112–116.

49. Gagnon, L. A Newly Discovered Antifibrotic Pathway Regulated by Two Fatty Acid Receptors: GPR40 and GPR84 / L. Gagnon, M. Leduc, J. F. Thibodeau, M.Z. Zhang, B. Grouix, F. Sarra-Bournet, W. Gagnon, K. Hince, M. Tremblay, L. Geerts, C.R.J. Kennedy, R.L. Hébert, A. Gutsol, C.E. Holterman, E. Kamto, L. Gervais, J. Ouboudinar, J. Richard, A. Felton, A. Laverdure, J.C. Simard, S. Létourneau, M.P. Cloutier, F.A. Leblond, S.D. Abbott, C. Penney, J.S. Duceppe, B. Zacharie, J. Dupuis, A. Calderone, Q.T. Nguyen, R.C. Harris, P. Laurin // *American Journal of Pathology*. – 2018. – Vol. 188. – № 5. – P. 1132–1148.

50. Galicia-Garcia, U. Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus / U. Galicia-Garcia, A. Benito-Vicente, S. Jebari, A. Larrea-Sebal, H. Siddiqi, K.B. Uribe, H. Ostolaza, C. Martín // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 17. – P. 6275.

51. Garcia-Ropero, A. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of SGLT2 inhibitors for type 2 diabetes mellitus: the latest developments / A. Garcia-Ropero, J.J. Badimon, C.G. Santos-Gallego // *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. – 2018. – Vol. 14. – № 12. – P. 1287–1302.

52. Geerling, J.J. Metformin lowers plasma triglycerides by promoting VLDL-triglyceride clearance by brown adipose tissue in mice / J.J. Geerling, M.R. Boon, G.C. van der Zon, S.A. van den Berg, A.M. van den Hoek, M. Lombès, H.M. Princen, L.M. Havekes, P.C. Rensen, B. Guigas // *Diabetes*. – 2014. – Vol. 63. – № 3. – P. 880–891.

53. Giglio, R.V. An update on the current and emerging use of thiazolidinediones for type 2 diabetes / R.V. Giglio, N. Papanas, A.A. Rizvi, M. Ciaccio, A.M. Patti, I. Ilias, A. Pantea Stoian, A. Sahebkar, A. Janez, M. Rizzo // *Medicina (Lithuania)*. – 2022. – Vol. 58. – № 10. – P. 1475.

54. Governa, P. FFAR1/GPR40: One target, different binding sites, many agonists, no drugs, but a continuous and unprofitable tug-of-war between ligand lipophilicity,

activity, and toxicity / P. Governa, M.C. Caroleo, G. Carullo, F. Aiello, E. Cione, F. Manetti // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2021. – Vol. 41. – P. 127969.

55. Guo, W.R. Metformin Alleviates Steatohepatitis in Diet-Induced Obese Mice in a SIRT1-Dependent Way / W.R. Guo, J. Liu, L.D. Cheng, Z.Y. Liu, X.B. Zheng, H. Liang, F. Xu // *Frontiers in Pharmacology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 704112.

56. Gutierrez-Carrasquilla, L. Effect of glucose improvement on spirometric maneuvers in patients with type 2 diabetes: The Sweet breath study / L. Gutierrez-Carrasquilla, E. Sanchez, F. Barbe, M. Dalmases, C. López-Cano, M. Hernández, F. Rius, P. Carmona, C. Hernández, R. Simó, A. Lecube // *Diabetes Care*. – 2019. – Vol. 42. – № 4. – P. 617–624.

57. Haeusler, R.A. Metabolic Signalling: Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling / R.A. Haeusler, T.E. McGraw, D. Accili // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2018. – Vol. 19. – № 1. – P. 31–44.

58. Hara, T. Ligands at free fatty acid receptor 1 (GPR40) / T. Hara // *Handbook of Experimental Pharmacology*. – 2017. – Vol. 236. – P. 1–16.

59. Hatting, M. Insulin regulation of gluconeogenesis / M. Hatting, C.D.J. Tavares, K. Sharabi, A.K. Rines, P. Puigserver // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2018. – Vol. 1411. – № 1. – P. 21–35.

60. Hauge, M. GPR40 (FFAR1) - Combined Gs and Gq signaling invitro is associated with robust incretin secretagogue action ex vivo and in vivo / M. Hauge, M.A. Vestmar, A.S. Husted, J.P. Ekberg, M.J. Wright, J. Di Salvo, A.B. Weinglass, M.S. Engelstoft, A.N. Madsen, Lückmann M, Miller MW, Trujillo ME, Frimurer TM, Holst B, Howard AD, Schwartz TW. // *Molecular Metabolism*. – 2014. – Vol. 4. – № 1. – P. 3–14.

61. He, X. Emerging roles of exosomal miRNAs in diabetes mellitus / X. He, G. Kuang, Y. Wu, C. Ou // *Clinical and Translational Science*. – 2021. – Vol. 11. – № 6. – P. e468.

62. Hedrington, M.S. Considerations when using alpha-glucosidase inhibitors in the treatment of type 2 diabetes / M.S. Hedrington, S.N. Davis // *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. – 2019. – Vol. 20. – № 18. – P. 2229–2235.

63. Holst, J.J. The incretin system in healthy humans: The role of GIP and GLP-1 / J.J. Holst // *Metabolism*. – 2019. – Vol. 96. – P. 46–55.
64. Hossain, Md. A. Current Antidiabetic Drugs: Review of Their Efficacy and Safety / Md. A. Hossain, R. Pervin // *Nutritional and Therapeutic Interventions for Diabetes and Metabolic Syndrome*. – ELSEVIER Academic Press, 2018. – P. 455–473.
65. Hou, L. Dihydromyricetin Ameliorates Inflammation-Induced Insulin Resistance via Phospholipase C-CaMKK-AMPK Signal Pathway / L. Hou, F. Jiang, B. Huang, W. Zheng, Y. Jiang, G. Cai, D. Liu, C.Y. Hu, C. Wang // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2021. – Vol. 2021. – P. 8542809.
66. Hudish, L.I. β Cell dysfunction during progression of metabolic syndrome to type 2 diabetes / L.I. Hudish, J.E.B. Reusch, L. Sussel // *Journal of Clinical Investigation*. – 2019. – Vol. 129. – № 10. – P. 4001–4008.
67. Ilonen, J. The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus / J. Ilonen, J. Lempainen, R. Veijola // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2019. – Vol. 15. – № 11. – P. 635–650.
68. Infante, M. Long-term metformin therapy and vitamin B12 deficiency: an association to bear in mind / M. Infante, M. Leoni, M. Caprio, A. Fabbri // *World Journal of Diabetes*. – 2021. – Vol. 12. – № 7. – P. 916–931.
69. International Diabetes Federation. Diabetes Atlas — 10th edition, 2021. – P. 136. – ISBN 978-2-930229-98-0
70. Jennison, E. Diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease / E. Jennison, J. Patel, E. Scorletti, C.D. Byrne // *Postgraduate Medical Journal*. – 2019. – Vol. 95. – № 1124. – P. 314–322.
71. Katayama, M. Circulating exosomal miR-20b-5p is elevated in type 2 diabetes and could impair insulin action in human skeletal muscle / M. Katayama, O.P.B. Wiklander, T. Fritz, K. Caidahl, S. El-Andaloussi, J.R. Zierath, A. Krook // *Diabetes*. – 2019. – Vol. 68. – № 3. – P. 515–526.
72. Khan, A. Insulin regulation of glucose uptake: A complex interplay of intracellular signalling pathways / A. Khan, J. Pessin // *Diabetologia*. – 2002. – Vol. 45. – № 11. – P. 1475–1483.

73. Khan, M.A.B. Epidemiology of Type 2 diabetes - Global burden of disease and forecasted trends / M.A.B. Khan, M.J. Hashim, J.K. King, R.D. Govender, H. Mustafa, J. Al Kaabi // *Journal of Epidemiology and Global Health*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 107–111.

74. Kimura, T. Metabolic functions of G protein-coupled receptors in hepatocytes – potential applications for diabetes and NAFLD / T. Kimura, S.P. Pydi, J. Pham, N. Tanaka // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10. – № 10. – P. 1445.

75. Kirwan, J.P. The essential role of exercise in the management of type 2 diabetes / J.P. Kirwan, J. Sacks, S. Nieuwoudt // *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. – 2017. – Vol. 84. – № 7. – P. S15–S21.

76. Klebig, M.L. Ectopic expression of the agouti gene in transgenic mice causes obesity, features of type II diabetes, and yellow fur / M.L. Klebig, J.E. Wilkinson, J.G. Geisler, R.P. Woychik // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1995. – Vol. 92. – № 11. – P. 4728–4732.

77. Klover, P.J. Hepatocytes: Critical for glucose homeostasis / P.J. Klover, R.A. Mooney // *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. – 2004. – Vol. 36. – № 5. – P. 753–758.

78. Kojima-Yuasa, A. Protective Effects of Hydrolyzed Nucleoproteins from Salmon Milt against Ethanol-Induced Liver Injury in Rats / A. Kojima-Yuasa, M. Goto, E. Yoshikawa, Y. Morita, H. Sekiguchi, K. Sutoh, K. Usumi, I. Matsui-Yuasa // *Marine Drugs*. – 2016. – Vol. 14. – № 12. – P. 232.

79. Kolb, H. Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes / H. Kolb, S. Martin // *BMC Medicine*. – 2017. – Vol. 15. – № 1. – P. 131.

80. Kovacic, J.C. The relationships between cardiovascular disease and diabetes: Focus on pathogenesis / J.C. Kovacic, J.M. Castellano, M.E. Farkouh, V. Fuster // *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. – 2014. – Vol. 43. – № 1. – P. 41–57.

81. Kuranov, S.O. Exploring bulky natural and natural-like periphery in the design of p-(benzyloxy)phenylpropionic acid agonists of free fatty acid receptor 1 (GPR40) / S.

O. Kuranov, O. A. Luzina, O. Onopchenko, I. Pishel, S. Zozulya, M. Gureev, N.F. Salakhutdinov, M. Krasavin // *Bioorganic Chemistry*. – 2020. – Vol. 99. – P. 103830.

82. Kurtz, R. GPCRs get fatty: The role of G protein-coupled receptor signaling in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease / R. Kurtz, M.F. Anderman, B.D. Shepard // *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2021. – Vol. 320. – № 3. – P. G304–G318.

83. Lambeir, A.M. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: An update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV / A.M. Lambeir, C. Durinx, S. Scharpe, I. De Meester // *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. – 2003. – Vol. 40. – № 3. – P. 209–294.

84. Lamoia, T.E. Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action / T.E. Lamoia, G.I. Shulman // *Endocrine Reviews*. – 2021. – Vol. 42. – № 1. – P. 77–96.

85. Lebedev, P. Correction of metabolic disturbances by functional food compositions in experimental obesity in CD-1 and agouti-yellow mice / P. Lebedev, A. Peresypkina, V. Gustinovich, O. Godunov, V. Gustinovich, M. Zatolokina, A. Goliusov, M. Pokrovskii // *Functional Foods in Health and Disease*. – 2022. – Vol. 12. – № 1. – P. 26–45.

86. Lebovitz, H.E. Thiazolidinediones: the forgotten diabetes medications / H.E. Lebovitz // *Current Diabetes Reports*. – 2019. – Vol. 19. – № 12. – P. 151.

87. Leturque, A. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing / A. Leturque, E. Brot-Laroche, M. Le Gall // *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. – 2009. – Vol. 296. – № 5. – P. E985–E992.

88. Ley, S.H. Contribution of the nurses' health studies to uncovering risk factors for type 2 diabetes: diet, lifestyle, biomarkers, and genetics / S.H. Ley, A.V. Ardisson Korat, Q. Sun, D.K. Tobias, C. Zhang, L. Qi, W.C. Willett, J.E. Manson, F.B. Hu // *American Journal of Public Health*. – 2016. – Vol. 106. – № 9. – P. 1624–1630.

89. Li, M. GPR40 agonist ameliorates liver X receptor-induced lipid accumulation in liver by activating AMPK pathway / M. Li, X. Meng, J. Xu, X. Huang, H. Li, G. Li, S. Wang, Y. Man, W. Tang, J. Li // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 25237.

90. Li, M. H. RLA8—A new and highly effective quadruple PPAR- α /G/D and GPR40 agonist to reverse nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis / M. H. Li, W. Chen, L. L. Wang, J.L. Sun, L. Zhou, Y.C. Shi, C.H. Wang, B. H. Zhong, W.G. Shi, Z.W. Guo // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2019. – Vol. 369. – № 1. – P. 67–77.

91. Li, X. H. Association between alcohol consumption and the risk of incident type 2 diabetes: A systematic review and dose-response meta-analysis / X.H. Li, F.F. Yu, Y.H. Zhou, J. He // *American Journal of Clinical Nutrition*. – 2016. – Vol. 103. – № 3. – P. 818–829.

92. Li, Z. Current status of GPR40/FFAR1 modulators in medicinal chemistry (2016–2019): a patent review / Z. Li, Z. Zhou, L. Zhang // *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. – 2020. – Vol. 30. – № 1. – P. 27–38.

93. Li, Z. Free fatty acid receptor 1 (FFAR1) as an emerging therapeutic target for type 2 diabetes mellitus: recent progress and prevailing challenges / Z. Li, X. Xu, W. Huang, H. Qian // *Medical Care Research and Review*. – 2018. – Vol. 38. – № 2. – P. 381–425.

94. Liang, G. 3-Deoxyglucosone induces insulin resistance by impairing insulin signaling in HepG2 cells / G. Liang, F. Wang, X. Song, L. Zhang, Z. Qian, G. Jiang // *Molecular Medicine Reports*. – 2016. – Vol. 13. – № 5. – P. 4506–4512.

95. Lin, C.L. Epigallocatechin gallate (EGCG) attenuates high glucose-induced insulin signaling blockade in human hepG2 hepatoma cells / C.L. Lin, J.K. Lin // *Molecular Nutrition and Food Research*. – 2008. – Vol. 52. – № 8. – P. 930–939.

96. Lin, K.Y. Update in the epidemiology, risk factors, screening, and treatment of diabetic retinopathy / K. Y. Lin, W. H. Hsih, Y. B. Lin, C.Y. Wen, T.J. Chang // *Journal of Diabetes Investigation*. – 2020. – Vol. 12. – № 8. – P. 1322–1325.

97. Lin, Y.C. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease / Y.C. Lin, Y.H. Chang, S.Y. Yang, K.D. Wu, T.S. Chu // *Journal of the Formosan Medical Association*. – 2018. – Vol. 117. – № 8. – P. 662–675.

98. Liu, J. The function, mechanisms, and clinical applications of metformin: potential drug, unlimited potentials / J. Liu, M. Zhang, D. Deng, X. Zhu // *Archives of Pharmacal Research*. – 2023. – Vol. 46. – P. 389–407.

99. Lu, Y. Protective effect of wedelolactone against CCl₄-induced acute liver injury in mice / Y. Lu, D. Hu, S. Ma, X. Zhao, S. Wang, G. Wei, X. Wang, A. Wen, J. Wang // *International Immunopharmacology*. – 2016. – Vol. 34. – P. 44–52.

100. Lv, W. Mechanisms and Characteristics of Sulfonylureas and Glinides / W. Lv, X. Wang, Q. Xu, W. Lu // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. – 2019. – Vol. 20. – № 1. – P. 37–56.

101. Ma, Z. Discovery of benzimidazole derivatives as potent and selective aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) inhibitors with glucose consumption improving activity / Z. Ma, L. Jiang, B. Li, D. Liang, Y. Feng, L. Liu, C. Jiang // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. – 2021. – Vol. 46. – P. 116352.

102. Mach, M. Discovery and development of CPL207280 as new GPR40/FFA1 agonist / M. Mach, K. Bazydło-Guzenda, P. Buda, M. Matłoka, R. Dzida, F. Stelmach, K. Gałązka, M. Wąsińska-Kałwa, D. Smuga, D. Hołowińska, U. Dawid, L. Gurba-Bryśkiewicz, K. Wiśniewski, K. Dubiel, J. Pieczykolan, M. Wieczorek // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2021. – Vol. 226. – P. 113810.

103. Magkos, F. Effects of moderate and subsequent progressive weight loss on metabolic function and adipose tissue biology in humans with obesity / F. Magkos, G. Fraterrigo, J. Yoshino, C. Luecking, K. Kirbach, S.C. Kelly, L. de Las Fuentes, S. He, A.L. Okunade, B.W. Patterson, S. Klein // *Cell Metabolism*. – 2016. – Vol. 23. – № 4. – P. 591–601.

104. Marin-Penalver, J.J. Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus / J.J. Marin-Penalver, I. Martin-Timon, C. Sevillano-Collantes, F.J. Del Canizo-Gomez // *World Journal of Diabetes*. – 2016. – Vol. 7. – № 17. – P. 354–395.

105. Mauricio, D. Chronic Diabetes Complications: The Need to Move beyond Classical Concepts / D. Mauricio, N. Alonso, M. Gratacos // *Trends in Endocrinology and Metabolism*. – 2020. – Vol. 31. – № 4. – P. 287–295.

106. Mikami, S. Discovery of phenylpropanoic acid derivatives containing polar functionalities as potent and orally bioavailable G protein-coupled receptor 40 agonists for the treatment of type 2 diabetes / S. Mikami, S. Kitamura, N. Negoro, S. Sasaki, M. Suzuki, Y. Tsujihata, T. Miyazaki, R. Ito, N. Suzuki, J. Miyazaki, T. Santou, N. Kanzaki, M. Funami, T. Tanaka, T. Yasuma, Y. Momose // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2012. – Vol. 55. – № 8. – P. 3756–3776.

107. Mohi-Ud-Din, R. Possible Pathways of Hepatotoxicity Caused by Chemical Agents / R. Mohi-Ud-Din, R.H. Mir, G. Sawhney, M.A. Dar, Z.A. Bhat // *Current Drug Metabolism*. – 2019. – Vol. 20. – № 11. – P. 867–879.

108. Müller, T.D. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) / T. D. Müller, B. Finan, S. R. Bloom, D. D'Alessio, D.J. Drucker, P.R. Flatt, A. Fritsche, F. Gribble, H.J. Grill, J.F. Habener, J.J. Holst, W. Langhans, J.J. Meier, M.A. Nauck, D. Perez-Tilve, A. Pocai, F. Reimann, D.A. Sandoval, T.W. Schwartz, R.J. Seeley, K. Stemmer, M. Tang-Christensen, S.C. Woods, R.D. DiMarchi, M.N. Tschöp // *Molecular Metabolism*. – 2019. – Vol. 30. – P. 72–130.

109. Nabrdalik, K. Gastrointestinal adverse events of metformin treatment in patients with type 2 diabetes mellitus: A systematic review, meta-analysis and meta-regression of randomized controlled trials / K. Nabrdalik, K. Skonieczna-Zydecka, K. Irlík, M. Hendel, H. Kwiendacz, I. Łoniewski, K. Januszkiewicz, J. Gumprecht, G.Y.H. Lip // *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2022. – Vol. 13. – P. 975912.

110. Nagarajan, P. Genetically modified mouse models for the study of nonalcoholic fatty liver disease / P. Nagarajan, M.J. Mahesh Kumar, R. Venkatesan, S.S. Majundar, R.C. Juyal // *World Journal of Gastroenterology*. – 2012. – Vol. 18. – № 11. – P. 1141–1153.

111. Nauck, M.A. Incretin hormones: Their role in health and disease / M.A. Nauck, J.J. Meier // *Diabetes, Obesity and Metabolism*. – 2018. – Vol. 20. – P. 5–21.

112. Oh, D.Y. G protein-coupled receptors as targets for anti-diabetic therapeutics / D.Y. Oh, J.M. Olefsky // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2016. – Vol. 15. – № 3. – P. 161–172.

113. On, S. Involvement of G-protein-coupled receptor 40 in the inhibitory effects of docosahexaenoic acid on SREBP1-mediated lipogenic enzyme expression in primary hepatocytes / S. On, H.Y. Kim, H.S. Kim, J. Park, K.W. Kang // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20. – № 11. – P. 2625.

114. Ookawara, M. The GPR40 full agonist SCO-267 improves liver parameters in a mouse model of nonalcoholic fatty liver disease without affecting glucose or body weight / M. Ookawara, K. Matsuda, M. Watanabe, Y. Moritoh // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2020. – Vol. 375. – № 1. – P. 21–27.

115. Osadebe, P.O. Phytochemical analysis, hepatoprotective and antioxidant activity of *Alchornea cordifolia* methanol leaf extract on carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats / P.O. Osadebe, F.B. Okoye, P.F. Uzor, N.R. Nnamani, I.E. Adiele, N.C. Obiano // *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. – 2012. – Vol. 5. – № 4. – P. 289–293.

116. Padhi, S. Type II diabetes mellitus: a review on recent drug based therapeutics / S. Padhi, A. K. Nayak, A. Behera // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. – 2020. – Vol. 131. – P. 110708.

117. Pafili, K. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) from pathogenesis to treatment concepts in humans / K. Pafili, M. Roden // *Molecular Metabolism*. – 2021. – Vol. 50. – P. 101122.

118. Pan, A. Relation of active, passive, and quitting smoking with incident type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis / A. Pan, Y. Wang, M. Talaei, F.B. Hu, T. Wu // *Lancet Diabetes Endocrinol*. – 2015. – Vol. 3. – № 12. – P. 958–967.

119. Pappachan, J.M. Diabetes and antidiabetic drugs / J.M. Pappachan, C.J. Fernandez, E.C. Chacko // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2019. – Vol. 66. – P. 3–12.

120. Peng, J. Central and peripheral leptin resistance in obesity and improvements of exercise / J. Peng, L. Yin, X. Wang // *Hormones and Behavior*. – 2021. – Vol. 133. – P. 105006.

121. Pernicova, I. Metformin-Mode of action and clinical implications for diabetes and cancer / I. Pernicova, M. Korbonits // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2014. – Vol. 10. – № 3. – P. 143–156.

122. Perreault, L. Novel therapies with precision mechanisms for type 2 diabetes mellitus / L. Perreault, J.S. Skyler, J. Rosenstock // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2021. – Vol. 17. – № 6. – P. 364–377.

123. Perry, R.J. Sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors: understanding the mechanisms for therapeutic promise and persisting risks / R.J. Perry, G.I. Shulman // *Journal of Biological Chemistry*. – 2020. – Vol. 295. – № 42. – P. 14379–14390.

124. Petro, A.E. Fat, carbohydrate, and calories in the development of diabetes and obesity in the C57BL/6J mouse / A.E. Petro, J. Cotter, D.A. Cooper, J.C. Peters, S.J. Surwit, R.S. Surwit // *Metabolism*. – 2004. – Vol. 53. – № 4. – P. 454–457.

125. Powell, E.E. Non-alcoholic fatty liver disease / E.E. Powell, V.W.S. Wong, M. Rinella // *The Lancet*. – 2021. – Vol. 397. – № 10290. – P. 2212–2224.

126. Raab, S. Incretin-like effects of small molecule trace amine-associated receptor 1 agonists / S. Raab, H. Wang, S. Uhles, N. Cole, R. Alvarez-Sanchez, B. Künnecke, C. Ullmer, H. Matile, M. Bedoucha, R.D. Norcross, N. Ottaway-Parker, D. Perez-Tilve, K. Conde Knappe, M.H. Tschöp, M.C. Hoener, S. Sewing // *Molecular Metabolism*. – 2016. – Vol. 5. – № 1. – P. 47–56.

127. Ramos-Lobo, A.M. The role of leptin in health and disease / A.M. Ramos-Lobo, J. Donato // *Temperature*. – 2017. – Vol. 4. – № 3. – P. 258–291.

128. Raza, S. Current treatment paradigms and emerging therapies for NAFLD/NASH / S. Raza, S. Rajak, A. Upadhyay, A. Tewari, R. Anthony Sinha // *Frontiers in Bioscience*. – 2021. – Vol. 26. – № 2. – P. 206–237.

129. Reed, J. A review of current trends with type 2 diabetes epidemiology, aetiology, pathogenesis, treatments and future perspectives / J. Reed, S. Bain, V. Kanamarlapudi // *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. – 2021. – Vol. 14. – P. 3567–3602.

130. Ren, G. Berberine improves glucose and lipid metabolism in HepG2 cells through AMPK α 1 activation / G. Ren, J.H. Guo, Y.Z. Qian, W.J. Kong, J.D. Jiang // *Frontiers in Pharmacology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1–9.

131. Roberts, T.J. Diagnosis and significance of pulmonary microvascular disease in diabetes / T.J. Roberts, A.T. Burns, R.J. MacIsaac, A.I. MacIsaac, D.L. Prior, A. La Gerche // *Diabetes Care*. – 2018. – Vol. 41. – № 4. – P. 854–861.
132. Roglic, G. WHO Global report on diabetes: A summary / G. Roglic // *International Journal of Noncommunicable Diseases*. – 2016. – Vol. 1. – № 1. – P. 3–8.
133. Rui, L. Energy metabolism in the liver / L. Rui // *Comprehensive Physiology*. – 2014. – Vol. 4. – № 1. – P. 177–197.
134. Ryu, T.Y. Hyperglycemia as a risk factor for cancer progression / T.Y. Ryu, J. Park, P.E. Scherer // *Diabetes and Metabolism Journal*. – 2014. – Vol. 38. – № 5. – P. 330–336.
135. Saeedi Saravi, S.S. The protective potential of metformin against acetaminophen-induced hepatotoxicity in BALB/C mice / S.S. Saeedi Saravi, A. Hasanvand, K. Shahkarami, A.R. Dehpour // *Pharmaceutical Biology*. – 2016. – Vol. 54. – № 12. – P. 2830–2837.
136. Sanchez-Rangel, E. Metformin: clinical use in type 2 diabetes / E. Sanchez-Rangel, S.E. Inzucchi // *Diabetologia*. – 2017. – Vol. 60. – № 9. – P. 1586–1593.
137. Sebastiani, G. G-protein-coupled receptors (GPCRs) in the treatment of diabetes: Current view and future perspectives / G. Sebastiani, E. Ceccarelli, M.G. Castagna, F. Dotta // *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2018. – Vol. 32. – № 2. – P. 201–213.
138. Senthilraja, P. In vitro cytotoxicity MTT assay in vero, HepG2 and MCF-7 cell lines study of marine yeast / P. Senthilraja, K. Kathiresan // *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. – 2015. – Vol. 5. – № 3. – P. 80–84.
139. Shi, Z. Differential expression of micro RNAs in omental adipose tissue from gestational diabetes mellitus subjects reveals miR-222 as a regulator of ER α expression in estrogen-induced insulin resistance / Z. Shi, C. Zhao, X. Guo, H. Ding, Y. Cui, R. Shen, J. Liu // *Endocrinology*. – 2014. – Vol. 155. – № 5. – P. 1982–1990.
140. Singh, M. Risks Associated with SGLT2 Inhibitors: an overview / M. Singh, A. Kumar // *Current Drug Safety*. – 2018. – Vol. 13. – № 2. – P. 84–91.

141. Singh, S. Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: A review / S. Singh, N.A. Osna, K.K. Kharbanda // *World Journal of Gastroenterology*. – 2017. – Vol. 23. – № 36. – P. 6549–6570.
142. Stein, S.A. Vildagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, for the treatment of type 2 diabetes / S.A. Stein, E.M. Lamos, S.N. Davis // *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. – 2014. – Vol. 10. – № 4. – P. 599–608.
143. Sturgill, M.G. Xenobiotic-induced hepatotoxicity: Mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function / M.G. Sturgill, G.H. Lambert // *Clinical Chemistry*. – 1997. – Vol. 43. – P. 1512–1526.
144. Sun, H. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 / H. Sun, P. Saeedi, S. Karuranga, M. Pinkepank, K. Ogurtsova, B.B. Duncan, C. Stein, A. Basit, J.C.N. Chan, J.C. Mbanya, M.E. Pavkov, A. Ramachandaran, S.H. Wild, S. James, W.H. Herman, P. Zhang, C. Bommer, S. Kuo, E.J. Boyko, D.J. Magliano // *Diabetes Research and Clinical Practice*. – 2022. – Vol. 183. – P. 109119.
145. Surwit, R.S. Diet-Induced Type II Diabetes in C57BL/6J Mice / R.S. Surwit, C.M. Kuhn, C. Cochrane, J.A. McCubbin, M.N. Feinglos // *Diabetes*. – 1988. – Vol. 37. – P. 1163–1167.
146. Tai, M.M. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves / M.M. Tai // *Diabetes Care*. – 1994. – Vol. 17. – № 2. – P. 152–154.
147. Targher, G. The complex link between NAFLD and type 2 diabetes mellitus — mechanisms and treatments / G. Targher, K.E. Corey, C.D. Byrne, M. Roden // *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. – 2021. – Vol. 18. – № 9. – P. 599–612.
148. Teng, D. Mechanistic Studies on the Stereoselectivity of FFAR1 Modulators / D. Teng, Y. Zhou, Y. Tang, G. Liu, Y. Tu // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2022. – Vol. 62. – № 15. – P. 3664–3675.
149. Tong, Y. Obesity and insulin resistance: Pathophysiology and treatment / Y. Tong, S. Xu, L. Huang, C. Chen // *Drug Discov Today*. – 2022. – Vol. 27. – № 3. – P. 822–830.

150. Vargas-Mendoza, N. Hepatoprotective effect of silymarin / N. Vargas-Mendoza, E. Madrigal-Santillan, A. Morales-Gonzalez, J. Esquivel-Soto, C. Esquivel-Chirino, Y. García-Luna, M. González-Rubio, J.A. Gayosso-de-Lucio, J.A. Morales-González // *World Journal of Hepatology*. – 2014. – Vol. 6. – № 3. – P. 144–149.

151. Verma, V.K. Comparison of hepatoprotective activity of *Swertia chirayita* and *Andrographis paniculata* plant of North–East India against CCl₄ induced hepatotoxic rats / V.K. Verma, K.K. Sarwa, A. Kumar, Md. K. Zaman // *Journal of Pharmacy Research*. – 2013. – Vol. 7. – № 7. – P. 647–653.

152. Viigimaa, M. Macrovascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus / M. Viigimaa, A. Sachinidis, M. Toumpourleka, K. Koutsampasopoulos, S. Alliksoo, T. Titma // *Current Vascular Pharmacology*. – 2019. – Vol. 18. – № 2. – P. 110–116.

153. Voisey, J. Agouti: From mouse to man, from skin to fat / J. Voisey, A. van Daal // *Pigment Cell Research*. – 2002. – Vol. 15. – № 1. – P. 10–18.

154. Walum, E. Acute oral toxicity / E. Walum // *Environmental Health Perspectives*. – 1998. – Vol. 106. – P. 497–503.

155. Weber, L.W.D. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model / L.W.D. Weber, M. Boll, A. Stampfl // *Critical Reviews in Toxicology*. – 2003. – Vol. 33. – № 2. – P. 105–136.

156. Wojciechowska, J. Diabetes and Cancer: A Review of Current Knowledge / J. Wojciechowska, W. Krajewski, M. Bolanowski, T. Kręcicki, T. Zatoński // *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*. – 2016. – Vol. 124. – № 5. – P. 263–275.

157. Wondmkun, Y.T. Obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes: Associations and therapeutic implications / Y.T. Wondmkun // *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*. – 2020. – Vol. 13. – P. 3611–3616.

158. Wu, S. Gastrointestinal adverse events of dipeptidyl peptidase 4 Inhibitors in type 2 diabetes: a systematic review and network meta-analysis / S. Wu, S. Chai, J. Yang, T. Cai, Y. Xu, Z. Yang, Y. Zhang, L. Ji, F. Sun, S. Zhan // *Clinical Therapeutics*. – 2017. – Vol. 39. – № 9. – P. 1780–1789.

159. Wu, Y. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention / Y. Wu, Y. Ding, Y. Tanaka, W. Zhang // *International Journal of Medical Sciences*. – 2014. – Vol. 11. – № 11. – P. 1185–200.

160. Xu, B. The current role of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors in type 2 diabetes mellitus management / B. Xu, S. Li, B. Kang, J. Zhou // *Cardiovascular Diabetology*. – 2022. – Vol. 21. – № 1. – P. 83.

161. Yadav, A. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance / A. Yadav, M.A. Kataria, V. Saini, A. Yadav // *Clinica Chimica Acta*. – 2013. – Vol. 417. – P. 80–84.

162. Yang, L. Hepatoprotective effects of polyphenols from *Ginkgo biloba* L. leaves on CCl₄-induced hepatotoxicity in rats / L. Yang, C.Z. Wang, J.Z. Ye, H.T. Li // *Fitoterapia*. – 2011. – Vol. 82. – № 6. – P. 834–840.

163. Yannaki, E. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs / E. Yannaki, E. Athanasiou, A. Xagorari, V. Constantinou, I. Batsis, P. Kaloyannidis, E. Proya, A. Anagnostopoulos, A. Fassas // *Experimental Hematology*. – 2005. – Vol. 33. – № 1. – P. 108–119.

164. Yaribeygi, H. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms / H. Yaribeygi, F.R. Farrokhi, A.F. Butler, A. Sahebkar // *Journal of Cellular Physiology*. – 2019. – Vol. 234. – № 6. – P. 8152–8161.

165. Yin, J. Berberine improves glucose metabolism through induction of glycolysis / J. Yin, Z. Gao, D. Liu, Z. Liu, J. Ye // *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. – 2008. – Vol. 294. – № 1. – P. E148–E156.

166. Zand, H. Signaling pathways linking inflammation to insulin resistance / H. Zand, N. Morshedzadeh, F. Naghashian // *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*. – 2017. – Vol. 11. – P. S307–S309.

167. Zhang, C. Current options and future directions for NAFLD and NASH treatment / C. Zhang, M. Yang // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 14. – P. 7571.

168. Zhang, G. Carbon tetrachloride (CCl₄) accelerated development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)/steatohepatitis (NASH) in MS-NASH mice fed western diet supplemented with fructose (WDF) / G. Zhang, X. Wang, T.Y. Chung, W. Ye, L. Hodge, L. Zhang, K. Chng, Y.E. Xiao, Y.J. Wang // BMC Gastroenterol. – 2020. – Vol. 20. – № 1. – P. 339.

169. Zhao, X. GLP-1 Receptor Agonists: Beyond Their Pancreatic Effects / X. Zhao, M. Wang, Z. Wen, Z. Lu, L. Cui, C. Fu, H. Xue, Y. Liu, Y. Zhang // Front Endocrinol (Lausanne). – 2021. – Vol. 12. – P. 721135.