

**ГОРБУНОВ ЕВГЕНИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ**

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

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Томск – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» и Обществе с ограниченной ответственностью «Научно-производственной фирме «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ»

**Научный руководитель:**

кандидат медицинских наук

**Тарасов Сергей Александрович**

**Научный консультант:**

доктор медицинский наук, профессор **Жданов Вадим Вадимович**

**Официальные оппоненты:**

**Ваизова Ольга Евгеньевна**, доктор медицинский наук, доцент, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакологии, профессор кафедры

**Мадонов Павел Геннадьевич**, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины, заведующий кафедрой

**Ведущая организация:** Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Защита диссертации состоится « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2016 г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 001.031.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» (634028, Томск, пр. Ленина 3, адрес сайта: <http://www.pharmso.ru>)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга»

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,  
доктор биологических наук

**Амосова Евдокия Наумовна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

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

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

СД ложится тяжелым финансовым бременем на пациентов и на систему здравоохранения государств в целом (Дедов И.И., 2013). В первую очередь, это относится к СД II типа. Распространенность и заболеваемость данным типом диабета растет во всем мире, в частности, в развивающихся странах, в сочетании с увеличением частоты ожирения и распространения западноевропейского образа жизни. СД II типа остается одной из ведущих

причин сердечно-сосудистых заболеваний, слепоты, терминальной стадии почечной недостаточности, ампутаций и госпитализаций. Более того, данный тип СД связан с повышенным риском развития рака, серьезными психическими заболеваниями, хроническими заболеваниями печени, ускорением развития артрита, а также другими причинами инвалидизации и смертельных исходов (Inzucchi S.E. et al., 2012).

Медикаментозная терапия СД II типа становится все более сложной (Inzucchi S.E. et al., 2012). В связи с расширяющимся арсеналом лекарственных препаратов появляются некоторые опасения, связанные с их потенциальными побочными эффектами (Bolen S. et al., 2007; Bergenstal R.M. et al., 2010), а также возникают вопросы о целесообразности интенсивного гипергликемического контроля на фоне макроваскулярных осложнений диабета (Greenfield S. et al., 2009; Matthews D.R., Tsapas A., 2008; Skyler J.S. et al., 2009; Yudkin J.S. et al., 2011). Так современные фармакологические подходы к лечению СД II типа состоят из нескольких основных пунктов, в основе которых лежит прием одного или нескольких пероральных сахароснижающих препаратов с возможностью их сочетания с инсулинотерапией (American Diabetes Association, Position statement: Standards of Medical Care in Diabetes 2012). При этом для сахароснижающих пероральных препаратов характерен ряд побочных эффектов, среди которых наиболее типичными являются следующие: набор веса, риск гипогликемии, побочные эффекты со стороны желудочно-кишечного тракта, развитие осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы, повышение хрупкости костной ткани. Кроме того, высокая частота приема препаратов и необходимость дополнительного обучения, а также высокая стоимость создают дополнительное неудобство при их использовании. Более того, очень часто требуется комбинированный прием препаратов, что наряду с повышением эффективности терапии повышает риск данных осложнений (Inzucchi S.E. et al., 2012).

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

**Степень разработанности.** Одним из подходов, позволяющих разрабатывать препараты, сочетающие в себе эффективность и безопасность, может быть использование феномена релиз-активности. Было продемонстрировано, что лекарственные препараты, содержащих так называемые «релиз-активные» формы антител (Эпштейн О.И., 2012), обладают принципиально новой проантигенной направленностью действия (сонаправленного с антигеном), основанной на способности релиз-активных форм антител, полученных в ходе технологической обработки исходной субстанции антител, изменять характер взаимодействия конкретного антигена (молекулы) с его мишенью посредством механизма конформационных изменений (Эпштейн О.И., 2013). Данный феномен был назван феноменом релиз-активности. Эффективность и безопасность

подобных препаратов были широко изучены как на различных экспериментальных моделях, так и в ходе клинических исследований (Эпштейн О.И., 2008; Chu X. et al., 2013; Tarasov S.A. et al., 2012; Kheyfets I. A. et al., 2012; Sizova L.V. 2011; Castagne V. et al., 2008; Chu X., Agmo A., 2008; Chu X. et al., 2008; Epstein O.I. et al., 2007; Kalueff A.V. et al., 2006; Dugina J.L. et al., 2005; Epstein O.I. et al., 2003; Karpova G.V. et al., 2009).

Одним из новых представителей данного класса лекарственных средств является комбинированный препарат, содержащий антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной синтазе оксида азота в релиз-активной форме, изучению антидиабетической активности и механизмов действия которого посвящена настоящая диссертационная работа.

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

**Задачи исследования:**

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

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

образом обусловлена компонентом, представляющим собой антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме.

Впервые показано, что антидиабетическая активность комбинированного препарата, содержащего антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, сравнима с таковой росиглитазона, перорального сахароснижающего препарата из группы тиазолидиндионов.

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

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

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

**Теоретическая и практическая значимость работы.** В результате проведенной работы получены экспериментальные данные об антидиабетической активности комбинированного препарата, содержащего антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, на модели СД II типа и о механизмах его действия. Выявлено, что по выраженности антидиабетического действия данный препарат не уступает такому пероральному сахароснижающему препарату, как росиглитазон. Материалы экспериментальных исследований вошли в комплект документов, представленных в Федеральную службу по надзору в сфере здравоохранения

и социального развития РФ и соответствующие службы других стран с целью получения разрешения на широкое медицинское применение препарата в РФ (Регистрационное удостоверение ЛСР-007376/10).

**Методология и методы исследования.** Согласно поставленным задачам выбраны современные высокоинформативные методические подходы. В качестве объектов исследования использовались крысы линии Goto-Kakizaki (Парижская колония) со спонтанно развивающимся СД II типа, дифференцированные мышечные клетки человека на 5 сутки после дифференцировки, а также дифференцированные адипоциты человека на 14 сутки после дифференцировки. Основные методы исследования: глюкозооксидазный метод (определение уровня концентрации глюкозы в крови); иммуноферментные (определение уровня концентрации инсулина, глюкагона, адипонектина, глюкагон-подобного пептида (GLP1), лептина); пероральный глюкозотолерантный тест (ПГТТ) (расчет интегрированных инкрементных значений содержания инсулина в плазме крови за 120 мин с момента введения глюкозы и интегрированных инкрементных значений содержания глюкозы в крови); сцинтилляционный метод (определение уровня захвата глюкозы *in vitro*); вестерн-блоттинг (определение содержания фосфорилированных и нефосфорилированных форм бета-субъединиц рецептора инсулина).

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

Основные положения диссертационной работы докладывались, обсуждались и представлялись на 48 ежегодном конгрессе европейской ассоциации по изучению диабета (Берлин, Германия, 2012); 6 конференции по исследованию лекарственных препаратов и терапии (Дубай, ОАЭ, 2013); XXI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2014); 17 Всемирном конгрессе по фундаментальной и клинической фармакологии (Кейптаун, Южная Африка, 2014); 7 Ежегодном международном конгрессе по вопросам исследований антител (Нанкин, Китай, 2015).

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

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 119 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов, списка используемой литературы. Работа иллюстрирована 8 рисунками и 10 таблицами. Библиографический указатель включает 196 источников, из них 28 отечественных, 168 иностранных.

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

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическое и практическое значение работы.

**В первой главе** проведен анализ отечественной и зарубежной научной литературы по теме исследования. В первом разделе представлены сведения о современных медикаментозных подходах в лечении СД II типа пероральными сахароснижающими препаратами, как одном из основных методов лечения больных с СД II типа и описываются наиболее часто встречающиеся побочные эффекты данных препаратов. Далее с привлечением большого количества литературных источников представлены экспериментальные данные о перспективности разработки препаратов, механизм действия которых связан с рецептором инсулина или сопряженными с ним сигнальными путями.

**Вторая глава** диссертации посвящена описанию материалов и методов исследования. В экспериментальных исследованиях использовано 60 крыс-самцов линии Goto-Kakizaki (Парижская колония) в возрасте 10-12 недель массой 272-278 г, выращенных в Университете Париж Дидро (Франция). Животные содержались в неполной барьерной системе в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). Крысы находились по 2 особи в пластиковых клетках при температуре воздуха 22<sup>0</sup>С и 12-часовом цикле день/ночь, при свободном доступе к воде и пище. Опыты проводили в весенне-летний период, а забор материала осуществляли в утренние часы.

Экспериментальным крысам в течение 28 суток (1-28 сутки) внутрижелудочно вводили 1 раз в сутки (в 9:00 часов) в виде водного раствора или комбинированный препарат, содержащий антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме (РАФ Ат к бета-субъединице ИР) и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме (РАФ Ат к eNOS) (ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ», Россия), в дозе 5 мл/кг/сут; или РАФ Ат к бета-субъединице ИР (ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ», Россия) в дозе 2,5 мл/кг/сут в смеси с дистиллированной водой в дозе 2,5 мл/кг/сут, так что суммарный вводимый объем составил 5 мл/кг/сут; или РАФ Ат к eNOS (ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ», Россия) в дозе 2,5 мл/кг/сут в смеси с

дистиллированной водой в дозе 2,5 мл/кг/сут, так что суммарный вводимый объем составил 5 мл/кг/сут. В качестве препарата сравнения экспериментальным крысам внутрижелудочно вводили росиглитазон (Interchim, Франция) 1 раз в сутки (в 9:00 часов) в течение 28 суток (1-28 сутки) в дозе 5 мг/кг/сут. Животные контрольных групп получали (5 мл/кг/сут) очищенную воду по схеме введения комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, или 1,0% раствор карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) по схеме введения росиглитазона. Вес животных, потребление воды и пищи, концентрацию глюкозы (анализатор глюкозы Beckman AU480, США) и инсулина (набор для проведения высокочувствительного иммуноферментного анализа (ИФА), ALPCO/Eurobio, Франция) в плазме крови натошак оценивали дважды в неделю в течение 28 суток. Концентрацию глюкагона (AbCys/ Eurobio, Франция), лептина (ALPCO/Eurobio, Франция), адипонектина (ALPCO/Eurobio, Франция), GLP1 (Yanaihara Institute Inc., Япония) в плазме крови оценивали на 1 и 28 сутки с использованием соответствующих ИФА наборов. Уровень гликированного гемоглобина (HbA1c) в цельной крови оценивали на 0 и 28 сутки (тест-система Micromat II, Bio-Rad, США). Кроме того, животные каждой группы подвергались пероральному глюкозотолерантному тесту (ПГТТ): до начала введения препаратов или соответствующих контролей (0 сутки), в 1 сутки (в 12:00, т.е. через 3 часа после введения препаратов или соответствующих контролей) и на 28 сутки (в 12:00, т.е. через 3 часа после введения препаратов или соответствующих контролей). ПГТТ проводили в 12:00 на неанестезированных животных, которые были отлучены от корма в 9:00. Животным вводили через внутрижелудочный зонд раствор глюкозы в концентрации, эквивалентной 2 г глюкозы на 1 кг веса животного. Образцы крови собирали из хвостовой вены до (0) и на 5, 10, 15, 30, 60, и 120 минут после введения глюкозы. Таким образом, изменение уровня инсулина и уровня глюкозы в ПГТТ рассчитывали как интегрированные инкрементные значения содержания инсулина или глюкозы, соответственно, в плазме крови за 120 мин с момента введения глюкозы (сумма значений в момент времени  $t_n - t_0$ , где  $t_0$  – это значение в момент времени 0 минут, а  $t_n$  – это значения в момент времени 5, 10, 15, 30, 60, 120 минут, соответственно).

Для оценки изменения чувствительности мышечных клеток человека к инсулину в исследовании были использованы *in vitro* дифференцированные мышечные клетки человека на 5 сутки после дифференцировки (суперлот пулированных и выращенных вместе клеток от 3 здоровых доноров). В микропланшет, содержащий миоциты в среде для дифференцировки клеток скелетной мышечной ткани (каталожный номер SKM-D, Zen-Bio, Inc., США), вносили или 50 мкл водного раствора комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, или 50 мкл растворителя, используемого для приготовления данного препарата, т.е. очищенную воду (отрицательный контроль). Через 72 часа клетки отделяли

от сыворотки и на 4 часа помещали в старвационный буфер (Zen-Bio, Inc., США) в присутствии вышеописанных образцов. После этого во все чашки добавляли раствор инсулина в дозе 10нМ, эквивалентной ЕС<sub>50</sub> и рассчитанной в ходе предварительного эксперимента. В качестве положительных контролей использовали инсулин в концентрациях 10нМ и 300нМ. Захват глюкозы инициировали добавлением смеси, содержащей 2-дезоксиглюкозу и <sup>3</sup>Н-2-дезоксиглюкозу (субстрат для ГЛЮТ-4). Для оценки неспецифического захвата глюкозы добавляли цитохалазин В в концентрации 10мкМ. После инкубации в течение 2 часов клетки промывали и лизировали. Захват глюкозы измеряли по количеству импульсов в минуту (срм)/лунка с помощью сцинтилляционного счётчика. Значения (срм), полученные для неспецифического захвата глюкозы в присутствии цитохалазина В, вычитали из значений (срм), полученных для комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, отрицательного контроля или положительных контролей, соответственно.

Изучение способности препарата влиять на сигнальный внутриклеточный путь ИР проводили в два этапа с использованием зрелых адипоцитов человека через 14 суток после дифференцировки (суперлот пулированных и выращенных вместе клеток от 5 здоровых доноров). На первом этапе оценивали способность комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, в отсутствие инсулина влиять на секрецию адипонектина. Зрелые адипоциты человека инкубировали во влажной камере в течение трех дней в присутствии или комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, или отрицательного контроля (очищенной воды), или одного из неспецифических контролей (РАФ Ат к каннабиноидному рецептору I типа или РАФ кроличьей неиммунной сыворотки), или диметилсульфоксида (ДМСО). Росиглитазон (Sigma Aldrich, США) использовали в качестве референсного препарата. Уровень секреции адипонектина в питательной среде измеряли с использованием количественного твердофазного ИФА (Zen-Bio, Inc., США). На втором этапе для подтверждения вовлеченности бета-субъединицы ИР в реализацию фармакологического действия комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, зрелые адипоциты человека инкубировали при 37°C во влажной камере с 5% содержанием CO<sub>2</sub> в течение трех дней в присутствии или комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, или растворителя, или культуральной среды. Затем клетки выдерживали в течение 15 минут в присутствии или воды, или инсулина (100 нМ). После проведения вестерн-блоттинга величины (интенсивности) индивидуальных полос (соответствующих фосфорилированной форме бета-субъединицы ИР и общей форме бета-субъединицы ИР) были рассчитаны в соответствии с инструкциями набора Bio-Rad ChemiDoc.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием непараметрических методов статистики пакета программ Statistica 6.1 и R version: 2.13.1, RCOM server version: 2.1. Из элементов описательной статистики вычислялись: среднее арифметическое значение ( $M$ ), стандартная ошибка среднего ( $m$ ). Статистическая значимость различий количественных признаков оценивалась с использованием непараметрических методов (критерий Манна-Уитни, критерий Вилкоксона, однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим Tukey HSD тестом). Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Третья глава** диссертации посвящена описанию результатов изучения антидиабетической активности на модели спонтанного СД II типа. Изучен механизм действия препарата. Полученные данные представлены в виде таблиц и рисунков.

**Четвертая глава** диссертационной работы посвящена обсуждению полученных результатов исследования с привлечением данных литературы.

### **Изучение антидиабетической активности на модели спонтанного сахарного диабета II типа**

Антидиабетическая активность комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, была продемонстрирована на модели спонтанного СД II типа с использованием крыс линии Goto-Kakizaki. Эффект препарата проявлялся в снижении концентрации глюкозы в плазме крови натощак, повышении чувствительности периферических тканей к глюкозе, повышении концентрации адипонектина к концу лечения.

Было показано, что применение комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, в течение 28 суток предотвращает прогрессирование СД, и значительно снижает уровень глюкозы в плазме крови по сравнению как с исходными значениями ( $147 \pm 4$  дг/мл против  $167 \pm 3$  дг/мл) ( $p < 0,001$ ), так и с отрицательным контролем ( $147 \pm 4$  дг/мл против  $165 \pm 4$  дг/мл) ( $p < 0,01$ ). Стоит отметить, что выраженность антидиабетического эффекта комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, превосходит таковой эффект компонентов, входящих в его состав. Ни один из компонентов комбинированного препарата не оказывал статистически значимого снижения уровня глюкозы в плазме крови по сравнению с отрицательным контролем (очищенная вода). Так, было показано, что введение экспериментальным животным РАФ Ат к бета-субъединице ИР в течение 28 суток также предотвращает прогрессирование СД. Однако снижение уровня глюкозы в плазме крови наблюдается только по сравнению с исходными значениями ( $153 \pm 4$  дг/мл против  $168 \pm 8$  дг/мл) ( $p < 0,001$ ). В группе животных, получавших РАФ Ат к eNOS, к концу лечения уровень глюкозы в плазме крови был не достоверно повышен как относительно

исходных значений ( $167 \pm 11$  дг/мл против  $163 \pm 10$  дг/мл), так и относительного отрицательного контроля (очищенная вода) ( $167 \pm 11$  дг/мл против  $165 \pm 4$  дг/мл).

В то же время росиглитазон, в отличие от комбинированного препарата, не оказывал достоверного влияния на базальный уровень глюкозы в плазме крови в течение всего периода терапии по сравнению с исходными показателями. Более того, статистически значимое снижение уровня глюкозы по сравнению с отрицательным контролем (КМЦ) наблюдалось лишь на 1-е сутки (Д1) ( $p < 0,01$ ).

Результаты ПГТТ свидетельствуют о том, что комбинированный препарат, содержащий РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, повышает чувствительность периферических тканей к глюкозе: ухудшение толерантности к глюкозе было менее выражено в группе экспериментальных животных, получавших данный препарат (рисунок 1). Так, значение AUC глюкозы в группе, получавший комбинированный препарат, увеличилось всего на 17% по сравнению с исходными значениями ( $p < 0,05$ ) (рисунок 1Г). При этом в группе, получавшей росиглитазон, значение AUC глюкозы увеличилось на 27% ( $p < 0,001$ ) (рисунок 1Е). В то же время, в группах отрицательных контролей (очищенная вода и 1% раствор КМЦ) наблюдалось существенное ( $p < 0,001$ ) снижение толерантности к глюкозе: значения AUC глюкозы выросли на 47% и 61%, соответственно (рисунок 1А и 1Д). Полученные данные показывают, что комбинированный препарат, содержащий РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, оказывает положительное влияние на гомеостаз глюкозы, причем эффект препарата не уступает эффекту препарата сравнения.

Кроме того, полученные данные позволяют сделать вывод, что способность комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, повышать чувствительность периферических тканей к глюкозе носит более выраженный характер по сравнению с эффектами отдельных компонентов, входящих в его состав. При этом, по отдельности компоненты, входящие в состав комбинированного препарата, оказывали различное действие на чувствительность периферических тканей к глюкозе. Так, в группе животных, получавших РАФ Ат к бета-субъединице ИР, значение AUC глюкозы увеличилось всего на 24% по сравнению с исходными значениями ( $p < 0,05$ ) (рисунок 1Б), что свидетельствует о положительном эффекте в отношении указанного параметра. Напротив, эффект РАФ Ат к eNOS был отрицательным – значение AUC глюкозы увеличилось на 64% по сравнению с исходными значениями ( $p < 0,05$ ), что даже выше, чем в группе отрицательного контроля (очищенная вода) (рисунок 1В). В целом полученные данные показывают, что комбинированный препарат оказывает положительное влияние на гомеостаз глюкозы. При этом антигипергликемическая активность комбинированного препарата опосредована, главным образом, одним

компонентом – РАФ Ат к бета-субъединице ИР. Кроме того, эффект комбинированного препарата не уступает эффекту препарата сравнения.

Важно отметить, что в ходе наблюдений за динамикой глюкозозависимой секреции инсулина ни комбинированный препарат, содержащий РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, ни отдельные компоненты, входящие в его состав, не оказывали значимого влияния на выработку инсулина в ответ на пероральное введение глюкозы (рисунок 2). Данный результат в совокупности с вышеприведенными данными позволяет сделать предположение, что активность комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, главным образом проявляется в инсулин-сенсibiliзирующем воздействии на ткани-мишени.

Комбинированный препарат, содержащий РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, оказывал влияние на уровень адипонектина, повышая его концентрацию на 28 сутки на 13% по сравнению со значениями в контрольной группе ( $p=0,07$ ).

При этом стоит отметить, что вес животных, уровень потребления воды, а также концентрация инсулина, глюкагона, лептина, GLP1 в плазме крови натощак и уровень HbA1c в цельной крови в группе, получавшей данный препарат, не отличались от соответствующих показателей в группе отрицательного контроля (очищенная вода).

Таким образом, в отличие от росиглитазона, комбинированный препарат не оказывал существенного действия на указанные параметры крови. Напротив, эффекты росиглитазона в отношении содержания инсулина, лептина и адипонектина отражают механизм действия препарата. Так, препарат сравнения достоверно снижал содержание инсулина, уменьшив его концентрацию в плазме крови на 33% ( $p<0,05$ ) к концу терапии; концентрация лептина, зафиксированная в 1-е (Д1) сутки терапии, оказалась на 45% ниже ( $p<0,01$ ), чем в группе отрицательного контроля (КМЦ); уровни адипонектина в 1-е (Д1) и на 28-е (Д28) сутки эксперимента были существенно выше, по сравнению с группой отрицательного контроля (КМЦ) ( $p<0,001$ ): содержание гормона было выше на 43% и 53%, соответственно.

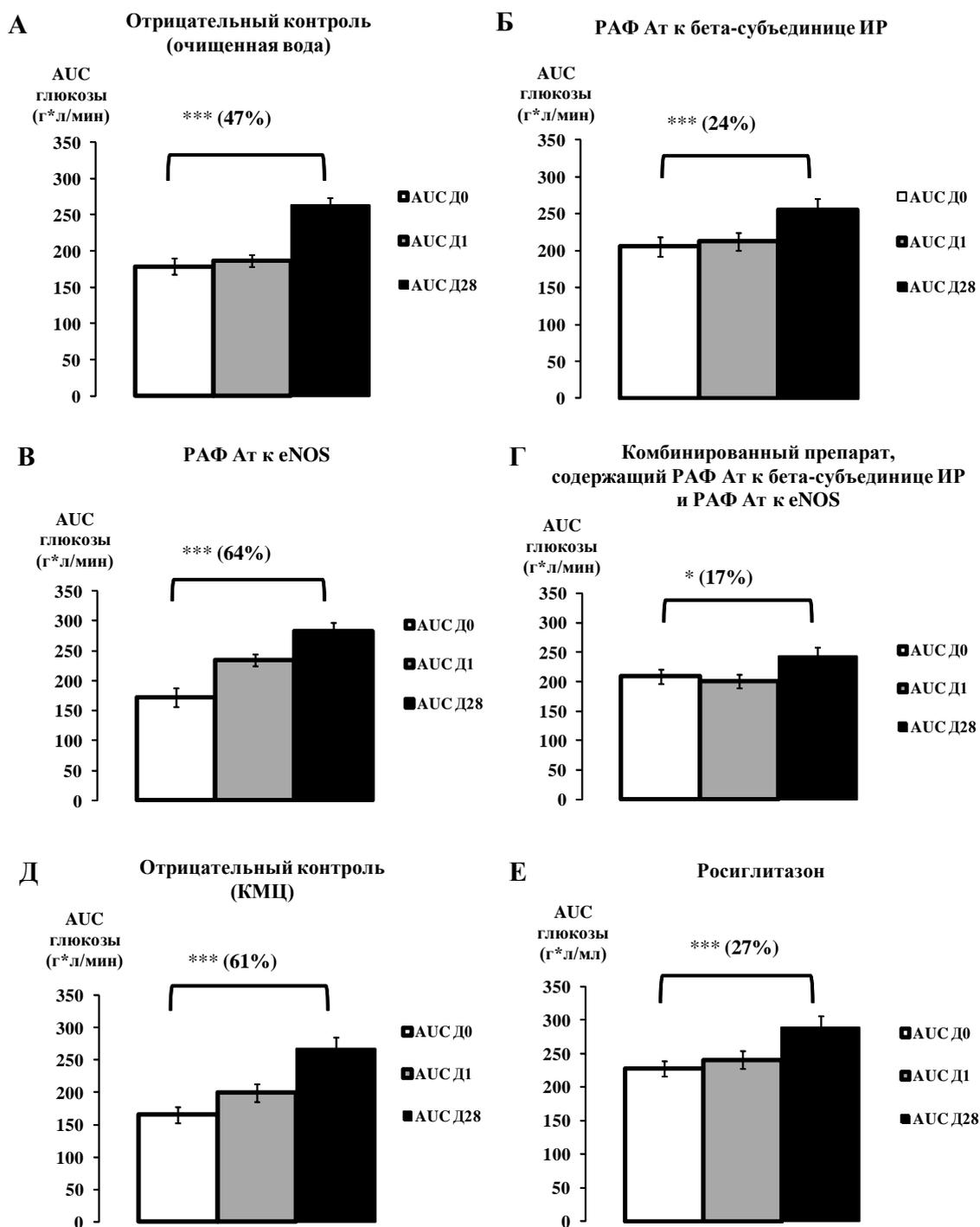


Рисунок 1 – Толерантность к глюкозе (2 г/кг п/о) у взрослых крыс-самцов линии GK/Rag с диабетом 2 типа до начала (D0), после кратковременного курса терапии (D1) и после продолжительного курса введения (D28) препаратов и соответствующих контролей.

Примечание. КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза; отличия от значения в D0 достоверны: \* – при  $p < 0,05$ ; \*\* – при  $p < 0,01$ ; \*\*\* – при  $p < 0,001$ .

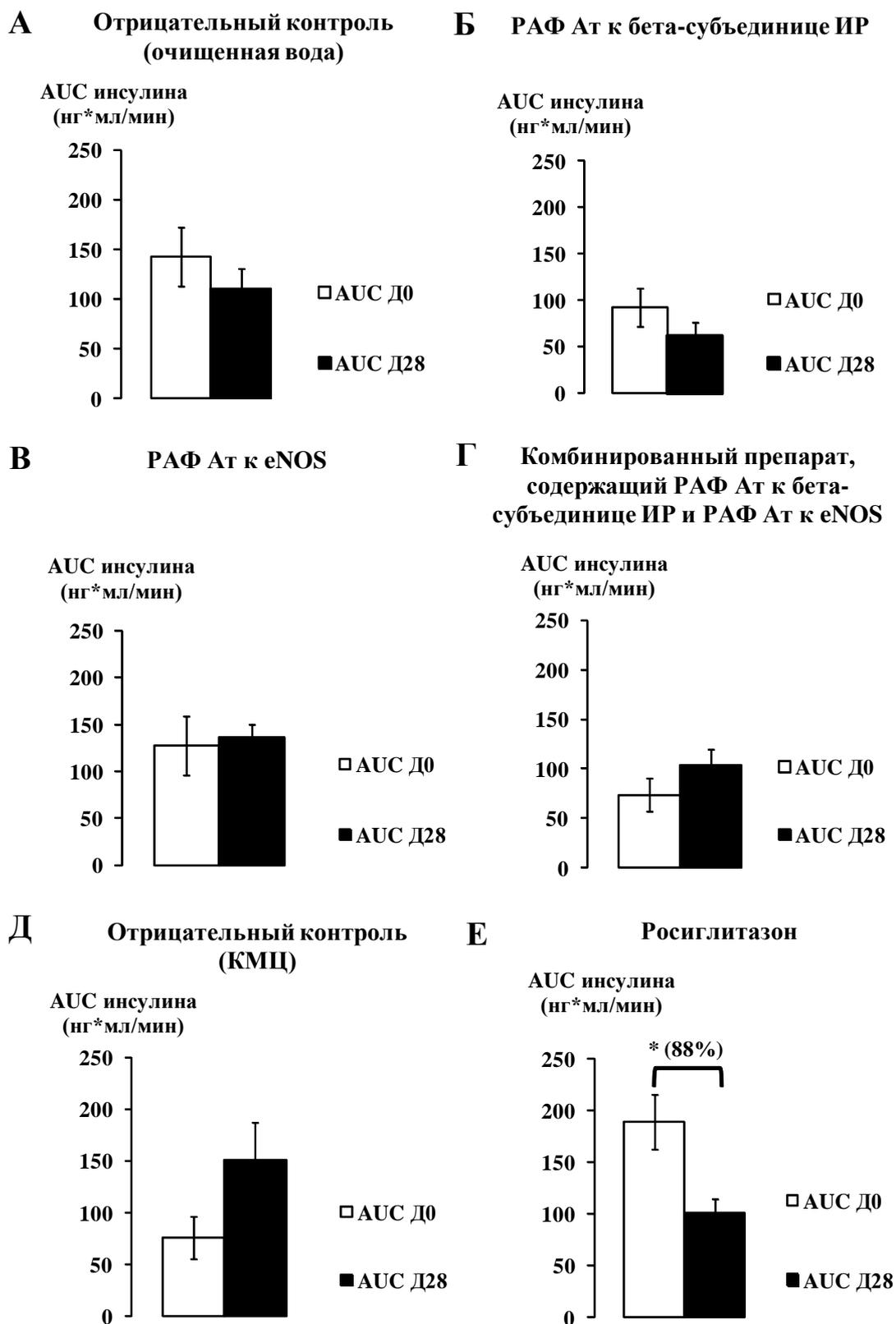


Рисунок 2 – Секреция инсулина в ответ на введение глюкозы (2 г/кг п/о) у взрослых крыс-самцов линии GK/Rag с диабетом 2 типа до начала (Д0) и после продолжительного курса введения (Д28) препаратов и соответствующих контролей.

Примечание. КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза; отличия от значения в Д0 достоверны: \* – при  $p < 0,05$ .

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

Полученные результаты сочетаются с ранее опубликованными данными об эффективности препарата в лечение STZ-индуцированного СД (Спасов А.А. и соавт., 2007). Так, было показано, что препарат нормализовал уровень глюкозы в крови, восстанавливал нарушенную толерантность к глюкозе, повышал выживаемость и нормализовал физиологическое развитие (набор веса). При этом, эффект препарата не уступал эффекту росиглитазона.

### **Изучение механизма действия**

Результаты *in vivo* исследования антидиабетической активности комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, позволили предположить, что препарат, вероятно, главным образом влияет на чувствительность тканей к действию инсулина. В клетках мышечной и жировой тканей инсулин стимулирует перемещение ГЛЮТ-4 из внутриклеточного пространства на клеточную поверхность, где транспортер выполняет свою функцию в снижении уровня глюкозы в плазме (Bryant N.J. et al., 2002). При этом ГЛЮТ-4 является главным переносчиком глюкозы в данных клетках. Принимая во внимание, что утилизация глюкозы в организме осуществляется главным образом мышечной тканью посредством работы ГЛЮТ-4 (Liu Y et al., 2013), было проведено *in vitro* исследование по оценке влияния комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, на уровень захвата глюкозы миоцитами в присутствии инсулина. В исследовании были

использованы *in vitro* дифференцированные мышечные клетки человека на 5 сутки после дифференцировки.

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

Исходя из активности, показанной для всего класса препаратов, а также данных изучения антидиабетической активности на экспериментальной модели СД II типа, было сделано предположение, что комбинированный препарат, содержащий РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, преимущественно оказывает модулирующее влияние на бета-субъединицу ИР, регулируемую киназную активность данного рецептора и последующую активацию сигнальных путей, ассоциированных с рецептором (De Meys P. and Whittaker J., 2002).

ИР является перспективной мишенью для терапии СД. Так, ранее были предложены и изучены препараты, которые по своим свойствам или похожи на естественный лиганд рецептора, или являются аллостерическими активаторами рецептора, или стабилизируют димерное состояние рецептора, или выступают в роли прямых активаторов тирозин-киназного домена рецептора, или напрямую активируют сигнальный каскад. К вышеперечисленным образцам относятся следующие препараты: Merck's L7 (Zhang B. et al., 1999; Li M. et al., 2001) и его аналог Compound 2 (Qureshi S.A. et al., 2000; Ding V.D. et al., 2002), 6Cl-TGQ (Cao Y. et al., 2013), DMAQ-B1 (Salituro G.M. et al., 2001), 2,5-дигидрокси-6-(1-метиллидол-3-yl)-3-фенил-1,4-бензохинон (Liu K. et al., 2000), выступающие в роли активатора ИР; Telik's TLK16998 (Li M. et al., 2001; Manchem V.P. et al., 2001) и TLK19780 (Pender C. et al., 2002), представляющие собой сенситизаторы ИР; Morin (Paoli P. et al., 2013) – неконкурентный ингибитор протеин тирозин фосфатазы 1B; соли арилалкиламин ванадия (García-Vicente S. et al., 2007) – активатор внутриклеточного сигнального пути вне зависимости от активации ИР. Их эффективность также была продемонстрирована на экспериментальных моделях СД на животных.

Для проверки гипотезы о том, что одним из основных механизмов действия комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, является модулирующее влияние на бета-субъединицу ИР, было проведено изучение его механизма действия на уровне периферических тканей. Исследование способности препарата влиять на сигнальный внутриклеточный путь ИР проводили в два этапа с использованием зрелых адипоцитов человека. На первом этапе оценивали способность комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, в отсутствие инсулина влиять на секрецию адипонектина данными клетками. Согласно Shehzad A. (2012), инсулин напрямую стимулирует экспрессию генов адипонектина. Также было показано, что обработка инсулином адипоцитов приводит к усилению секреции адипонектина. Точный механизм действия инсулина на биосинтез адипонектина остается неизвестным, но в то же время существует несколько возможных путей, опосредующих его активность. Было сделано предположение, что инсулин, связываясь со своим рецептором, активирует внутриклеточный каскад, который приводит к подавлению активности FoxO1, супрессора рецептора, активируемого пролифератором пероксисом гамма, что в свою очередь приводит к индукции биосинтеза адипонектина (Shehzad A., 2012).

Инкубация зрелых адипоцитов человека в течение 72 часов вместе с комбинированным препаратом, содержащим РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, привела к статистически значимому увеличению концентрации адипонектина в культуральной среде по сравнению с показателями, полученными для других тестируемых соединений (Таблица 1). Неспецифические контроли (РАФ Ат к каннабиноидному рецептору I типа или РАФ кроличьей неиммунной сыворотки) не оказывали статистически значимого влияния на секрецию адипонектина, а выраженность их эффекта была сравнима с фоновым значением отрицательного контроля (очищенная вода) и с фоновым значением 0,1% ДМСО. Препарат сравнения росиглитазон стимулировал продукцию адипонектина, но выраженность эффекта была ниже по сравнению с эффектом комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, и была незначительна по сравнению со значениями, полученными для ДМСО.

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

Таблица 1 – Эффект комбинированного препарата, содержащего антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, и росиглитазона на продукцию адипонектина зрелыми адипоцитами человека ( $M \pm m$ )

Образец	Концентрация Адипонектина (нг/мл)	Число повторов
Комбинированный препарат, содержащий антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме	27,97±3,08*###	6
Антитела к каннабиноидному рецептору I типа в релиз-активной форме	4,66±0,63	5
Кроличья неиммунная сыворотка в релиз-активной форме	5,18±0,28	6
Очищенная вода	8,73±1,59	6
Диметилсульфоксид (0,1%)	4,44±0,63	4
Росиглитазон (1 мкМ)	14,22±1,47	4

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

При этом важно отметить, что сам по себе адипонектин играет важную роль в развитии СД II типа (Shehzad A., 2012). Наиболее значимую роль адипонектин играет в сенсбилизации печени и мышц к действию инсулина у людей и грызунов (Luo R. et al., 2012). Адипонектин повышает чувствительность к инсулину, увеличивая метаболизм глюкозы и липидов, усиливает метаболизм глюкозы, помимо сигнальной системы инсулина (Stumvoll M. et al., 2005). И наконец, имеются данные, говорящие о том, что влияние адипонектина на функцию и выживаемость бета-клеток, которые являются ключевыми факторами развития СД II типа наряду с резистентностью к инсулину (Dunmore S.J. and Brown J.E., 2012).

На втором этапе для подтверждения вовлеченности бета-субъединицы ИР в реализацию фармакологического действия комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, зрелые адипоциты человека инкубировали в течение 72 часов в присутствии или комбинированного препарата, или отрицательного контроля (очищенная вода), или культуральной среды. После этого клетки выдерживали в течение 15 минут в присутствии или воды, или инсулина (100 нМ).

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

субъединиц ИР (рисунок 3). Такое соотношение рассчитывали на основании интенсивностей окрашивания индивидуальных полос, измеренных после добавления или комбинированного препарата, содержащего РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, или контролей (культуральная среда или очищенная вода). Среднее значение соотношения фосфорилированных форм бета-субъединиц ИР к общим формам бета-субъединиц ИР для комбинированного препарата статистически значимо ( $p < 0,001$ ) превышало значения, полученные как для контроля (культуральная среда), так и для отрицательного контроля (очищенная вода), и составило  $0,146 \pm 0,014$  относительных единиц против  $0,048 \pm 0,003$  и против  $0,013 \pm 0,007$  относительных единиц, соответственно.

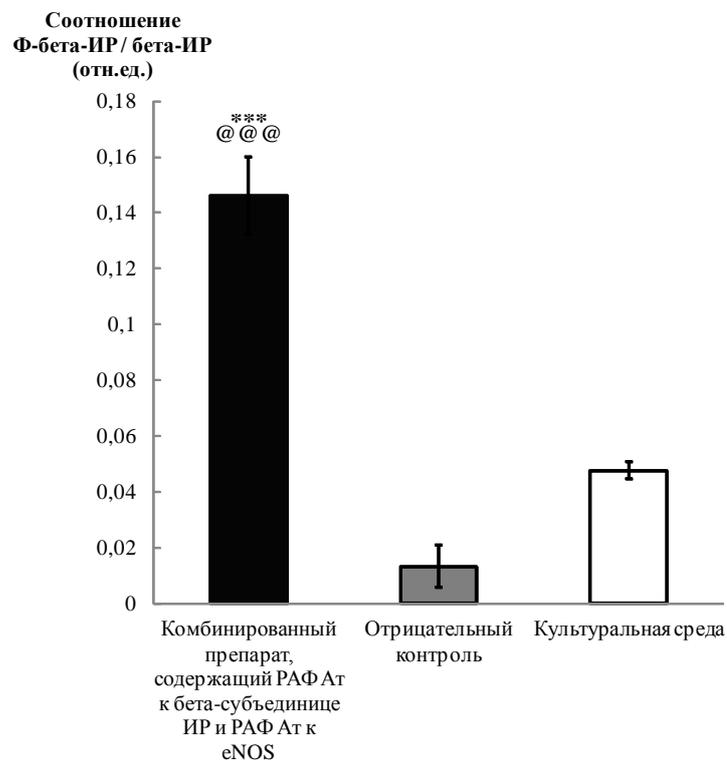


Рисунок 3 – Влияние комбинированного препарата, содержащего антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, на соотношение фосфорилированных форм бета-субъединиц рецептора инсулина (Ф-бета-ИР) к общим формам бета-субъединиц рецептора инсулина (бета-ИР), экспрессируемых на мембранах зрелых адипоцитов человека в среде, не содержащей инсулин.

Примечание: \*\*\* – отличия от контроля (культуральная среда) достоверны ( $p < 0,001$ ); @ @ @ – отличия от отрицательного контроля (очищенная вода) достоверны ( $p < 0,001$ ).

Кроме того, полученные данные свидетельствуют о том, что комбинированный препарат, содержащий РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, усиливает способность инсулина повышать соотношение фосфорилированных форм бета-субъединиц ИР к общим формам бета-субъединиц ИР (рисунок 4). Так, добавление инсулина (100 нМ) к зрелым адипоцитам человека, предварительно обработанным данным препаратом, вызывало статистически значимое ( $p < 0,001$ ) повышение оцениваемого

параметра по сравнению с аналогичными значениями, полученными для адипоцитов, которые подвергались предварительной обработке культуральной средой или отрицательным контролем (очищенная вода): интенсивность составила  $0,359 \pm 0,004$  относительных единиц против  $0,194 \pm 0,006$  относительных единиц и против  $0,081 \pm 0,005$  относительных единиц, соответственно. Отрицательный контроль (очищенная вода) оказывал негативный эффект на соотношение фосфорилированных форм бета-субъединиц ИР к общим формам бета-субъединиц ИР в присутствии инсулина (100 нМ) ( $p < 0,001$  по сравнению с показателем «культуральная среда + инсулин»): интенсивность составила  $0,081 \pm 0,005$  относительных единиц против  $0,194 \pm 0,006$  относительных единиц, соответственно.

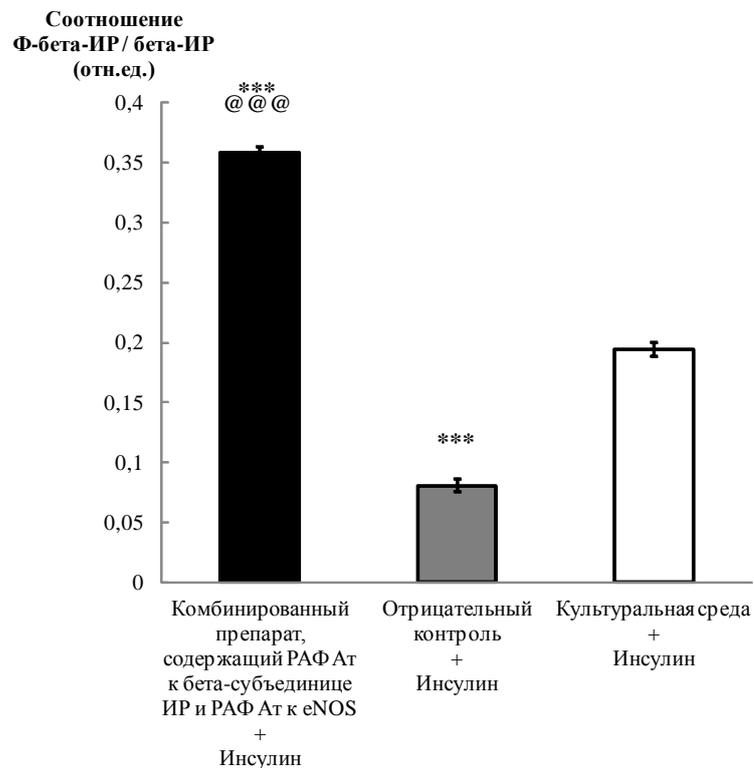
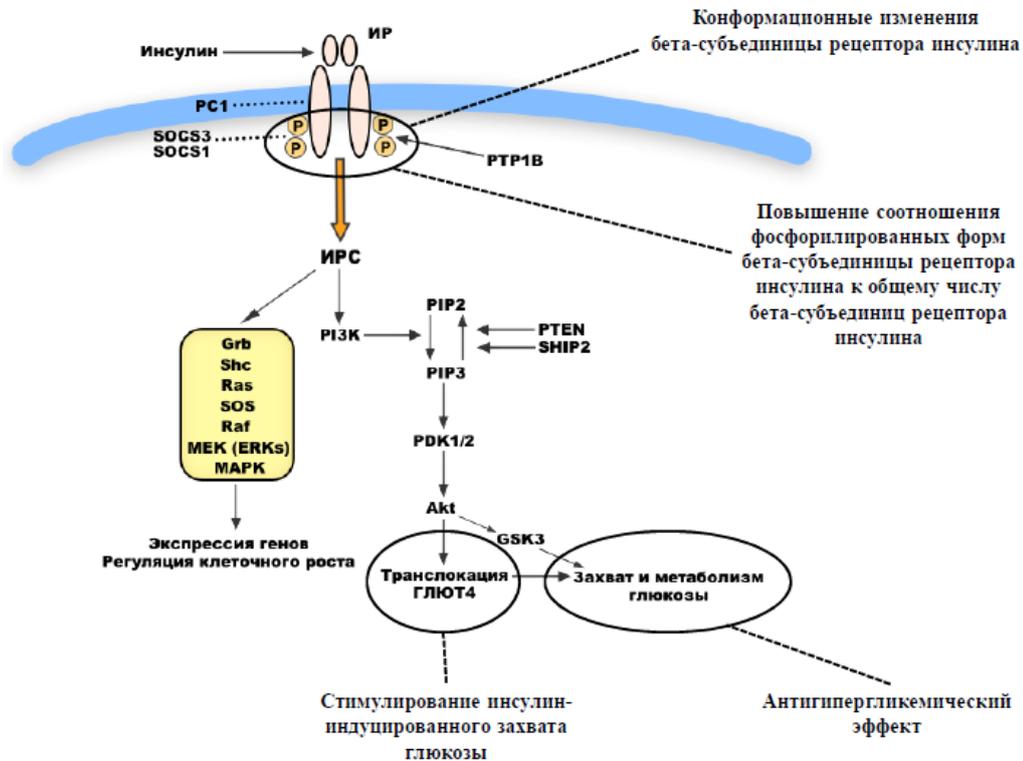


Рисунок 4 – Влияние комбинированного препарата, содержащего антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, на соотношение фосфорилированных форм бета-субъединиц рецептора инсулина (Ф-бета-ИР) к общим формам бета-субъединиц рецептора инсулина (бета-ИР), экспрессируемых на мембранах зрелых адипоцитов человека в среде, содержащей инсулин (100 нМ).

Примечание: \*\*\* – отличия от контроля (культуральная среда) достоверны ( $p < 0,001$ ); @@@ – отличия от отрицательного контроля (очищенная вода) достоверны ( $p < 0,001$ ).

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

повышать продукцию адипонектина в отсутствии инсулина, можно представить механизм действия препарата следующим образом (схема сигнального пути ИР адаптирована из Lebeche D. et al. (2008)):



Примечание: GLUT4, инсулин-зависимый транспортер глюкозы 4; ИР, инсулиновый рецептор; ИРС, субстрат рецептора инсулина; Akt, протеинкиназа В; ERK, киназа, регулируемая внеклеточными сигналами; Grb, белок, связывающий гормон роста; GSK3, киназа 3 гликогенсинтазы; MAPK, митоген-активируемая протеинкиназа; MEK, MAPK/ERK киназа; P, фосфат; PC1, гликопротеин 1 плазматической мембраны; PDK1/2, фосфоинозитол-зависимая протеинкиназа; PI3K, фосфатидилинозитол-3-киназа; PIP2, фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат; PIP3, фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат; PTEN, фосфатаза и гомолог тензина; PTP1B, протеинтирозинфосфатаза 1B; Raf, серин-треониновая протеинкиназа; Ras, малая ГТФаза; Shc, SH2-содержащий белок, связанный с коллагеном; SHIP2, инозитол-5'-фосфатаза 2, содержащая SH2-домен; SOCS1, SOCS 3, супрессоры 1 и 3 сигнальных путей, активируемых цитокинами; SOS, фактор обмена гуаниновых нуклеотидов для малой ГТФазы Ras.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные эксперименты продемонстрировали, что комбинированный препарат, содержащий РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, обладает антидиабетической активностью на экспериментальной модели СД II типа. При этом антидиабетическая активность данного препарата превышает активность отдельных компонентов, входящих в его состав, и, главным образом, обусловлена компонентом, представляющим собой РАФ Ат к бета-субъединице ИР.

Впервые показано, что протестированная на экспериментальной модели СД II типа антидиабетическая активность комбинированного препарата, содержащего антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-

активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, сравнима с таковой росиглитазона.

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

Было показано, что комбинированный препарат, содержащий РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, увеличивает соотношение фосфорилированных форм бета-субъединиц ИР к общим формам бета-субъединиц ИР. Более того, комбинированный препарат, содержащий РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, усиливает способность инсулина повышать соотношение фосфорилированных форм бета-субъединиц ИР к общим формам бета-субъединиц ИР.

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод о том, что комбинированный препарат, содержащий РАФ Ат к бета-субъединице ИР и РАФ Ат к eNOS, является перспективным для использования в терапии СД II типа.

### **ВЫВОДЫ**

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

- свидетельствует об активации внутриклеточного сигнального пути рецептора инсулина.
5. Комбинированный препарат, содержащий антитела к бета-субъединице рецептора инсулина в релиз-активной форме и антитела к эндотелиальной NO-синтазе в релиз-активной форме, повышает отношение фосфорилированных форм бета-субъединицы рецептора инсулина к общему числу бета-субъединиц рецептора инсулина зрелых адипоцитов человека, а также повышает способность инсулина увеличивать данное соотношение.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. The novel oral drug subetta exerts anti-diabetic effect in the diabetic GK/Par rat // 48th EASD Annual Meeting. – Berlin – Germany. – 2012. – S365-366 (with Tarasov S.A., Epstein O.I., Bailbe D., et al.)
2. The novel oral drug subetta exerts an antidiabetic effect in the diabetic Goto-Kakizaki rat: comparison with rosiglitazone // J Diabetes Res – 2013. – vol. 2013, Article ID 763125, 9 pages, 2013. doi:10.1155/2013/763125 (with Bailbé D., Philippe E., Tarasov S.A., et al.)
3. Subetta treatment increases adiponectin secretion by mature human adipocytes in vitro // Int J Endocrinol – 2013. – vol. 2013, Article ID 925874, 4 pages, 2013. doi:10.1155/2013/925874 (with Nicoll J., Tarasov S.A., Epstein O.I.)
4. A novel opportunity for diabetes mellitus: treatment by polyclonal antibodies in release active form // 6th ICDDT. – Dubai. – UAE. – 2013. – p.48 (with Ertuzun I.A., Julia L. Dugina J.L., Tarasov S.A.).
5. Субетта повышает чувствительность мышечных клеток человека к инсулину // Тез. докл. XXI Российского Национального конгресса «Человек и лекарство». – М. – 2014. – С.226-227 (в соавт. с Родионовой Н.Н., Мысливец М.А., Тарасовым С.А.).
6. A novel approach for diabetes mellitus management: conformational change of beta-subunit of the insulin receptor by polyclonal antibodies in release-active form // WCP2014. – Cape Town. – South Africa. – 2014. – p.236 (with Tarasov S., Epstein O.).
7. Субетта повышает чувствительность мышечных клеток человека к инсулину // Бюл экспер биол – 2015. – Т.159, №4. – С.454-456 (в соавт. с Nicoll J., Мысливцом А.А., Качаевой Е.В., Тарасовым С.А.).
8. Antibodies in special release-active form regulates biological activity of targets by modification of its conformation state instead of neutralization // 7th ICA. – Nanjing. – China. – 2015. – p.090.
9. Subetta increases phosphorylation of insulin receptor  $\beta$ -subunit alone and in the presence of insulin // Nutr Diabetes – 2015. – vol. 5, e169; doi:10.1038/nutd.2015.20 (with J. Nicoll, E.V. Kachaeva, S.A. Tarasov, O.I. Epstein).

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

Ат	–	антитела
ВОЗ	–	Всемирная организация здравоохранения
ГЛЮТ	–	транспортер глюкозы
ГТФ	–	гуанозинтрифосфат
ДМСО	–	диметилсульфоксид
ИР	–	рецептор инсулина
ИРС	–	субстрат рецептора инсулина
ИФА	–	иммуноферментный анализ
КМЦ	–	карбоксиметилцеллюлоза
ПГТТ	–	пероральный глюкозотолерантный тест
РА	–	релиз-активность
РАФ	–	релиз-активная форма
СД	–	сахарный диабет
Akt	–	протеинкиназа В
AUC	–	площадь под кривой
срм	–	количество импульсов в минуту
eNOS	–	эндотелиальная NO-синтаза
ERK	–	киназа, регулируемая внеклеточными сигналами
GLP-1	–	глюкагон-подобный пептид 1
Grb	–	белок, связывающий гормон роста
GSK3	–	киназа 3 гликогенсинтазы
HbA1c	–	гликированный гемоглобин
MAPK	–	митоген-активируемая протеинкиназа
NO	–	синтаза оксида азота
PC1	–	гликопротеин 1 плазматической мембраны
PDK1/2	–	фосфоинозитол-зависимая протеинкиназа
PI3K	–	фосфатидилинозитол-3-киназа
PIP2	–	фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат
PIP3	–	фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат
PTEN	–	фосфатаза и гомолог тензина
PTP1B	–	протеинтирозинфосфатаза 1В
Raf	–	серин-треониновая протеинкиназа
Ras	–	малая ГТФаза
Shc	–	SH2-содержащий белок, связанный с коллагеном
SHIP2	–	инозитол-5'-фосфатаза 2, содержащая SH2-домен
SOCS1	–	супрессор 1 сигнальных путей, активируемых цитокинами
SOCS3	–	супрессор 3 сигнальных путей, активируемых цитокинами
SOS	–	фактор обмена гуаниновых нуклеотидов для малой ГТФазы
STZ	–	стрептозоцин