

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА ИЗ ГОНАД МОРСКИХ ЕЖЕЙ

И.Е. Макаренко^{1*}, **Н.М. Фаустова**², канд. хим. наук, **Г.В. Ванатиев**^{1, 2}, **И.Н. Уракова**², канд. хим. наук, **О.Н. Пожарицкая**², канд. фарм. наук, **М.Н. Макарова**², докт. мед. наук, **В.Г. Макаров**², докт. мед. наук, профессор, **А.Н. Шиков**, канд. фарм. наук

¹Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова;

191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41

²Санкт-Петербургский институт фармации; 195248, Санкт-Петербург, Партизанская ул., 27, офис 424

*E-mail: makarenko2909@gmail.com

Приведена оценка биологических эффектов *in vitro* и *in vivo* гипогликемического препарата, полученного из гонад морских ежей. Установлена специфическая, ингибирующая активность исследуемого препарата в отношении активности дипептидилпептидазы четвертого типа, сопоставимая с синтетическими ингибиторами и превышающая активность природных ингибиторов (сухих экстрактов одуванчика лекарственного и крапивы двудомной). В условиях эксперимента исследуемый препарат проявил умеренный сахароснижающий и антиоксидантный эффекты, сопоставимые с ситаглиптином.

Ключевые слова: дипептидаза-4, ГПП-1, морской еж, *Strongylocentrotus droebachiensis*, липидный экстракт.

По данным Международной диабетической федерации, в настоящее время в мире сахарным диабетом (СД) болеют более 285 млн человек и к 2030 г. эта цифра, вероятно, превысит 438 млн человек, в основном за счет больных СД 2 типа (СД-2). На 1 января 2013 г. в России насчитывалось более 3,78 млн пациентов с СД, из них 3,45 млн с СД-2 [1]. СД-2 развивается чаще у людей среднего и пожилого возраста [2,3]. Главным патогенетическим механизмом заболевания является снижение чувствительности тирозинкиназных инсулиновых рецепторов (ГЛЮТ-4) к инсулину. В результате происходит нарушение прохождения глюкозой клеточных мембран жировой, мышечной ткани, ткани печени [4]. Также после манифестации СД-2 отмечается снижение функции β -клеток поджелудочной железы в отношении секреции инсулина. Главными факторами в развитии диабета считают физиологические причины: низкую физическую нагрузку, повышенное потребление пищи, стресс [5]. Кроме этого, одной из причин ожирения и СД-2 может являться мутация рецепторов к длинноцепочечным жирным кислотам (GPR-120) по типу R270H, которая приводит к инсулинорезистентности и воспалению в жировой ткани [6]. В последние годы большое внимание уделяется изучению роли гормонов желудочно-кишечного тракта (глюкагоноподобный пептид-1 ГПП-1 и глюкозо-

зависимый инсулинотропный полипептид – ГИП) в регуляции секреции инсулина и, следовательно, в регуляции гомеостаза глюкозы в организме человека [7].

Для снижения инсулинорезистентности, восстановления нарушенной продукции инсулина применяют ингибиторы фермента дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4), на фоне приема которых достигается повышение уровня ГПП-1. В настоящее время их считают перспективным, активно развивающимся классом сахароснижающих препаратов [8]. Актуален дальнейший поиск веществ, проявляющих гипогликемические свойства, регулирующих метаболические процессы и активность системы антиоксидантной защиты. Активно стимулируют секрецию ГПП-1 и ГИП липиды. Перспективным для снижения инсулинорезистентности является прием лигандов к GPR-120, в частности свободных жирных кислот [9].

Продукты переработки рыбы и гидробионтов – богатый источник полиненасыщенных жирных кислот, в основном ω -3 и ω -6, которые способствуют снижению заболеваемости сердечно-сосудистыми заболеваниями, а также оказывают положительное влияние при гипертонии, воспалении, аритмии, псориазе и раке [10]. Особый интерес для выделения комплекса биологически активных веществ для лечения диабета представляют гонады морского ежа *Strongylocentrotus droebachiensis*. Содержащиеся в гонадах морских ежей полиненасыщенные жирные кислоты известны своими гипогликемическими, антиатерогенными, гипотензивными, тромболитическими эффектами, способностью улучшать функцию эндотелия. Эйкозопентаеновая кислота, содержащаяся в гонадах морских ежей, снижает синтез триглицеридов и холестерина, уменьшает свертываемость крови и предотвращает образование тромбов [11]. В предыдущих исследованиях нами было установлено наличие у липидного экстракта гонад морских ежей умеренного сахароснижающего и гипотензивного эффектов [12].

Цель настоящего исследования – установление возможных механизмов противодиабетического действия препарата, полученного из гонад морских ежей.

Экспериментальная часть

Объект исследования – препарат (условное название «КЛС-073»), представляющий собой комплекс биологически активных веществ (БАВ), выделенных из гонад морских ежей. Последних предварительно очищали от балластных веществ смесью хлороформа и этилового спирта. Экстракцию БАВ проводили этиловым спиртом при комнатной температуре с последующим высушиванием. КЛС-073 содержит: 45–70% суммы сложных липидов, свободных жирных кислот и стероидов, из них 8–20% – фосфолипиды, 25–40% – пептиды и аминокислоты, около 2,0% – каротиноиды и токоферолы [13–14]. Препаратами сравнения служили «Ситаглиптин» и «Метформин».

In vitro влияние КЛС-073 на энзиматическую активность ДПП-4 оценивали с помощью набора DPP 4 Inhibitor Screening Kit. В качестве позитивного контроля использовали селективный ингибитор к ДПП-4 (S)-этилпиперидин-3-карбоксилат [15], отрицательного контроля – растворитель.

Способ оценки активности фермента ДПП-4 основан на использовании в качестве хромогенного субстрата Gly-L-Pro p-nitroanilide, из которого под действием ДПП-4 образуются дипептид Gly-Pro и p-нитроанилин [16]. В присутствии ингибиторов ДПП-4 концентрация продуктов реакции снижается. Оптическую плотность продукта реакции (p-нитроанил) определяли на спектрофотометре xMark™ при длине волны 405 нм и вычисляли процент ингибирования фермента. Предварительно методика была валидирована по всем показателям [17].

Исследование *in vivo* проводили на 60 белых нелинейных мышах-самцах массой 19–22 г (питомник лабораторных животных РАН «Рапполово»), которые содержались в стандартных условиях вивария на полном сбалансированном пищевом рационе для лабораторных животных. Эксперименты выполнялись согласно требованиям методических руководств и нормативных документов, в соответствии с правилами лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ Р 53434-2009) и одобрены на заседании биоэтической комиссии Санкт-Петербургского института фармации.

Животные были разделены на 6 экспериментальных групп по 10 особей в каждой. 1-я группа (интактная) – животные без моделируемой патологии и без лечения. Группы 2а и 2б (контрольные) – животные с моделируемой патологией, без лечения. Животным группы 2а вводили кукурузное масло, группы 2б – раствор метилцеллюлозы. 3-, 4- и 5-я группы включали животных с моделируемой патологией, получавших лечение в течение 14 дней: группа 3 – КЛС-073 в дозе 2,0 мг/кг,

группа 4 – метформин в дозе 100 мг/кг, группа 5 – ситаглиптин в дозе 100 мг/кг. Препараты вводили внутрижелудочно через зонд. КЛС-073 растворяли в кукурузном масле, препараты сравнения – в растворе метилцеллюлозы. Негенетическую форму экспериментального СД 2-го типа воспроизводили по S.Islam & H.Choi [18] и моделировали стрептозотоцином (внутрибрюшинно, 60 мг/кг) с предварительным, за 15 мин, введением никотинамида (интраперитонеально, 210 мг/кг).

Введение препаратов начинали через 10 дней после введения стрептозотоцина. Количественное определение глюкозы периферической крови проводили с помощью глюкометра OneTouch Horizon перед 1-м введением препаратов, на 5-й и 14-й дни после введения препаратов. Концентрацию восстановленного глутатиона (ВГ), ТБК-активных продуктов (малонового диальдегида – МДА) и уровень стабильных метаболитов оксида азота (NO) определяли спектрофотометрически на спектрофотометре PharmaSpec 1700 на 14-е сутки введения препаратов.

В исследовании *in vivo* не было обнаружено отличий между показателями в контрольных группах 2а и 2б. Ранее нами было установлено отсутствие у кукурузного масла и раствора метилцеллюлозы эффектов на определяемые показатели, поэтому для увеличения статистической значимости результатов данные по указанным контрольным группам приводятся обобщенно.

Статистическую обработку полученных результатов исследований проводили с помощью методов параметрической (t-критерий Стьюдента) статистики и пакета статистических программ Statistica 6.0. Построение сигмоидных кривых и вычисление IC_{50} осуществляли по программе Origin 4.1.

В исследованиях *in vitro* для препарата сравнения ситаглиптина IC_{50} составила 0,032 мкг/мл, что соответствует данным литературы [19]. При использовании КЛС-073 значения IC_{50} составили 20 мкг/мл, при применении специфического ингибитора ДПП-4 S-ЭПК – 2,1 мкг/мл. Известно, что природные соединения обладают активностью в отношении ДПП-4. Так, для 5% сухого экстракта крапивы IC_{50} – 1490 мкг/кг, для экстракта одуванчика – 1470 мкг/кг [20]. По сравнению с другими природными ингибиторами ДПП-4 препарат КЛС-073 проявил более выраженную ингибирующую активность. Сходное с КЛС-073 действие имеет другой специфический ингибитор Diprotin A [21]. Таким образом, в условиях *in vitro* у исследуемого препарата КЛС-073 было выявлено ингибирующее действие в отношении ДПП-4.

Для подтверждения наличия у исследуемого препарата биологических эффектов в живом организме КЛС-073 был протестирован в условиях экспериментального СД. Данные по его влиянию на динамику изменения уровня глюкозы приведены в табл. 1.

При развитии экспериментальной патологии уровень глюкозы в периферической крови животных кон-

трольной группы был статистически значимо выше, чем у интактных животных, начиная с 10 дня эксперимента. На фоне введения препаратов отмечали достоверное снижение уровня глюкозы периферической крови у экспериментальных животных по сравнению с таковыми в контрольной группе, начиная с 5-го дня лечения. Максимально выраженный эффект наблюдали при применении метформина – к концу исследования наблюдали снижение концентрации уровня глюкозы на 34% относительно исходных значений ($p=0,001$). Применение ситаглиптина и КЛС-073 оказало сходное действие – введение препаратов привело к снижению глюкозы крови в среднем на 20% ($p=0,002$ и $0,035$ соответственно) после 14 дней лечения препаратами.

На фоне экспериментального стрептозотоцинового диабета у животных контрольной группы наблюдали уменьшение концентрации ВГ в 2,3 раза и увеличение МДА и NO почти в 2 раза, что свидетельствует о наличии окислительного стресса (табл. 2). Применение КЛС-073 и препаратов сравнения привело к нормализации уровня ВГ и МДА крови экспериментальных животных, что свидетельствует о наличии у данных препаратов антиоксидантного эффекта. Однако на фоне приема КЛС-073 и ситаглиптина значительно (в 3 раза по сравнению с контролем) увеличилась активность NO, что, вероятно, обусловлено стимулирующим влиянием инкретиномиметиков на эндотелиальную NO-синтазу

(eNOS). Данный эффект известен для ситаглиптина [22] и опосредованно обусловлен его фармакологическим эффектом – стимуляцией синтеза ГПП-1.

Увеличение синтеза NO под действием ГПП-1 является одним из основных механизмов антигипертензивного действия инкретиномиметиков. [23]. Таким образом, стимуляция синтеза NO – предполагаемый механизм антигипертензивного действия, установленный нами у КЛС-073 в ходе предыдущих исследований [12].

Биологические эффекты КЛС-073 в живом организме значительно превышали результаты, полученные *in vitro*, и, следовательно, не могут быть объяснены только за счет ингибирования ДПП-4. Многие гидробионты, в частности, морские ежи, содержат большое количество свободных жирных кислот [24], которые были обнаружены и в исследуемом препарате (45–70%). Данные вещества являются естественными лигандами к GPR-120, за счет чего реализуют целый ряд биологических эффектов. Так, активация GPR-120 в макрофагах и адипоцитах ведет к снижению провоспалительного действия, снижению резистентности к инсулину [25], ингибированию секреции грелина, торможению чувства голода [26]. Исходя из этого, 2-й возможный механизм действия КЛС-073 – активация GPR-120, чем и обусловлены его биологические эффекты в отношении нормализации углеводного обмена

Таблица 1

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ГЛЮКОЗЫ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ МЫШЕЙ-САМЦОВ

Группа	n	Содержание глюкозы в периферической крови животных, ммоль/л			
		день исследования			
		0 (до индукции патологии)	10-й (1-й день введения препаратов)	15-й	24-й
1-я. Интактная	10	4,6±0,2	4,7±0,3	4,6±0,4	4,8±0,2
2а+2б. Контроль (диабет+плацебо)	20	4,8±0,4	10,7±0,5*	10,8±0,4*	11,7±0,4*
3-я. КЛС-073 (диабет+ КЛС-073, 2,0 мг/кг)	10	4,5±0,3	10,4±0,5*	8,9±0,5*. **	8,2±0,3*. **
4-я. Ситаглиптин (диабет+ситаглиптин, 100 мг/кг)	10	4,5±0,2	9,7±0,7*	8,7±0,4*. **	7,7±0,5*. **
5-я. Метформин (диабет+метформин, 100 мг/кг)	10	4,7±0,3	9,6±0,7*	7,7±0,5*. **	6,4±0,4*. **

Примечание. Здесь и в табл. 2: * – различия статистически значимы по сравнению с интактной группой ($p<0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой ($p<0,05$).

Таблица 2

ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТОВ НА АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ НА ФОНЕ СТРЕПТОЗОТАЦИНОВОГО ДИАБЕТА

Группа	n	Содержание, мкмоль/л		
		ВГ	МДА	NO
1-я. Интактная	10	0,60±0,04	11,1±0,4	137,4±9,7
2а+2б. Контроль (диабет+плацебо)	20	0,26±0,05*	19,0±1,1*	213,8±13,0*
3-я. КЛС-073 (диабет+ КЛС-073, 2,0 мг/кг)	10	0,66±0,05**	9,4±0,6*. **	458,7±29,9*. **
4-я. Ситаглиптин (диабет+ситаглиптин, 100 мг/кг)	10	0,52±0,07**	12,7±0,6*. **	379,8±23,4*
5-я. Метформин (диабет+метформин, 100 мг/кг)	10	0,57±0,06**	11,4±0,5*. **	197,4±15,3*

на. Однако данная гипотеза требует дальнейшего экспериментального подтверждения.

Таким образом, как показали проведенные исследования, КЛС-073 как природный препарат комплексного действия весьма перспективен для коррекции сахарного диабета 2-го типа и связанных с ним заболеваний.

Выводы

1. У исследуемого препарата из морских ежей (КЛС-073) *in vitro* установлена специфическая ингибирующая активность в отношении ДПП-4. Значения IC_{50} составило 20 мкг/мл, что превосходит активность экстрактов растительного происхождения, но уступает синтетическим препаратам.

2. Введение животным КЛС-073 в дозе 2 мг/кг оказало сопоставимые эффекты с синтетическим ингибитором ситаглиптином в дозе 100 мг/кг. Отмечено снижение количества глюкозы периферической крови экспериментальных животных, увеличение уровня NO. Оба вышеперечисленных эффекта характерны для стимуляции синтеза ГПП-1.

3. При изучении возможного механизма действия КЛС-073 предположили, что он не только ингибитор ДПП-4, но и агонист рецептора GPR120.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Дедов И.И. и др. Результаты реализации подпрограммы «Сахарный диабет» Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями 2007–2012 годы». Сахарный диабет, 2013; 2. (Dedov I.I. et al. Report on subprogramme «Diabetes mellitus» Federal target program «Prevention and control of socially significant diseases 2007–2012 years». Diabetes mellitus, 2013; 2. (in Russian)).
2. Hinman R.M., Smith M.J., Cambier J.C. B cells and type 1 diabetes... in mice and men. Immunology letters, 2014.
3. Xie Z., Chang C., Zhou Z. Molecular Mechanisms in Autoimmune Type 1 Diabetes: a Critical Review. Clinical reviews in allergy & immunology, 2014; 1–19.
4. Samuel V.T., Petersen K.F., Shulman G.I. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. The Lancet, 2010; 375. (9733): 2267–2277.
5. Воротников А.В., Ткачук В.А. Молекулярные механизмы развития резистентности к инсулину. Сахарный диабет, 2014; 2. (Vorotnikov A.V., Tkachuk V.A. Molecular mechanisms of the development of insulin resistance. Diabetes mellitus, 2014; 2. (in Russian)).
6. Ichimura A. et al. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. Nature, 2012; 483. (7389): 350–354.
7. Green B.D., Flatt P.R. Incretin hormone mimetics and analogues in diabetes therapeutics. Best Practice & Research Clinical Endocrinology

& Metabolism, 2007; 21. (4): 497–516.

8. Palalau A.I. et al. DPP-4 inhibitors in clinical practice. Postgraduate medicine, 2009; 121. (6): 70–100.

9. Diakogiannaki E., Gribble F.M., Reimann F. Nutrient detection by incretin hormone secreting cells. Physiology & behavior, 2012; 106. (3): 387–393.

10. Alfano C.M. et al. Fatigue, inflammation, and ω -3 and ω -6 fatty acid intake among breast cancer survivors. Journal of Clinical Oncology, 2012; 30. (12): 1280–1287.

11. Крыжановский С.А., Вититнова М.Е. Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты и сердечно-сосудистая система. Физиология человека, 2009; 35. (4): 110–123. (Kryzhanovskiy S.A., Vititnova M.E. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular system. Human Physiology, 2009; 35. (4): 110–123. (in Russian)).

12. Makarenko I.E. et al. Effects of lipid extract of sea urchins gonads in metabolic syndrome animal model. Planta Medica, 2013; 79. (13): PB44.

13. Shikov A.N. et al. Composition of fatty oil of sea urchin eggs from Barents Sea. Planta Medica, 2011; 77. (12): PH4.

14. Shikov A.N. et al. Phospholipids and amino-acid composition of eggs of sea urchin from Barents Sea. Planta Medica, 2012; 78. (11): P18.

15. Chen P. et al. Synthesis and evaluation of ((1< i> R</i>)-1-amino-2-(2, 5-difluorophenyl) ethyl) cyclohexanes and 4-((1< i> R</i>)-1-amino-2-(2, 5-difluorophenyl) ethyl) piperidines as DPP-4 inhibitors. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2011; 21. (6): 1880–1886.

16. Lu I. et al. A three-dimensional pharmacophore model for dipeptidyl peptidase IV inhibitors. European journal of medicinal chemistry, 2008; 43. (8): 1603–1611.

17. FDA C. Guidance for industry: bioanalytical method validation. US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CV), 2001.

18. Islam M.S., Choi H. Nongenetic model of type 2 diabetes: a comparative study. Pharmacology, 2007; 79. (4): 243–249.

19. Wang A. et al. Potency, selectivity and prolonged binding of saxagliptin to DPP4: maintenance of DPP4 inhibition by saxagliptin in vitro and ex vivo when compared to a rapidly-dissociating DPP4 inhibitor. BMC pharmacology, 2012; 12. (1): 2.

20. Mardanyan S. et al. Dipeptidyl peptidase IV and adenosine deaminase inhibition by Armenian plants and antidiabetic drugs. Int. J. Diabetes Metab., 2011; 19: 69–74.

21. Yogisha S., Ravisha K.A. Dipeptidyl Peptidase IV inhibitory activity of Mangifera indica. J. Nat. Prod., 2010; 3: 76–79.

22. Liu L. et al. Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitor Sitagliptin Protects Endothelial Function in Hypertension Through a Glucagon-Like Peptide 1-Dependent Mechanism. Hypertension, 2012; 60. (3): 833–841.

23. Pereira D.M. et al. Amino acids, fatty acids and sterols profile of some marine organisms from Portuguese waters. Food chemistry, 2013; 141. (3): 2412–2417.

24. Okerson T. et al. Effects of exenatide on systolic blood pressure in subjects with type 2 diabetes. American journal of hypertension, 2010; 23. (3): 334–339.

25. Oh D. Y. et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. Cell, 2010; 142. (5): 687–698.

26. Zhao Y. et al. Phenotypic characterization of GPR120-expressing cells in the interstitial tissue of pancreas. Tissue and Cell, 2013; 45. (6): 421–427.

Поступила 28 марта 2014 г.

EVALUATION OF THE EFFICACY OF A DRUG FROM URCHIN GONADS

I.E. Makarenko¹; N.M. Faustova², PhD; G.V. Vanatiev^{1,2}; I.N. Urakova², PhD; O.N. Pozharitskaya², PhD; M.N. Makarova², PhD; Professor V.G. Makarov², MD; A.N. Shikov^{1,2}, PhD

¹I.I. Mechnikov North-Western State Medical University; 41, Kirochnaya St., Saint Petersburg 191015

²Saint Petersburg Institute of Pharmacy; 27, Partizanskaya St., Office 424, Saint Petersburg 195248

SUMMARY

The *in vitro* and *in vivo* biological effects of an antihyperglycemic drug derived from urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) gonads. An investigation of dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) established the specific inhibitory activity of the test agent. IC_{50} was 20 μ g/ml, which was similar to that of the synthetic DPP-4 inhibitors, such as the specific inhibitor S-EPC and the drug Sitagliptin (2.1 and 0.032 μ g/ml, respectively); and greater than the activity of natural DPP-4 inhibitors (5% dry extracts from dandelion (*Taraxacum officinale*) and common nettle (*Urtica dioica*)).

An investigation of male mice with experimental streptozotocin nicotinamide-induced diabetes mellitus showed that when used therapeutically (intragastrically for 14 days), the test drug produced a moderate glucose-lowering effect and an antioxidant one, which were similar to those of sitagliptin.

The test urchin-derived drug was suggested to be not only a DPP-4 inhibitor, but also a GPR120 receptor agonist.

Key words: dipeptidase-4, glucagone-like peptide-1, urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*, lipid extract.