

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РФ
ФГБУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ИМ. В.А.АЛМАЗОВА» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РФ

ОТЧЕТ
О ВЫПОЛНЕНИИ ГОСУДАРСТВЕННОГО ЗАДАНИЯ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

по теме:

**«Изучение молекулярно-биологических основ кардиопротективных и
вазопротективных механизмов действия сахароснижающих
препараторов с использованием экспериментальных моделей сахарного
диабета у животных»
(промежуточный)**

Раздел № 1 – «Фундаментальные научные исследования», тема № 16

Руководитель темы
Директор Института Эндокринологии

Гринева Е.Н.

Руководитель темы
Директор Института
Экспериментальной медицины

Галагудза М.М.

Санкт-Петербург, 2014

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы,
директор Института
Эндокринологии,
д.м.н.

Гринева Е.Н.

Руководитель темы,

Галагудза М.М.

директор Института
Экспериментальной
медицины, д.м.н.

Директор Института
Молекулярной
биологии и генетики, к.м.н.
Зав. НИЛ «Диабетологии»,
д.м.н.

Вед.н.с. НИЛ «Клинической
эндокринологии», д.м.н.

Ст.н.с. НИЛ «Диабетологии» , к.м.н.

Ст.Н.с. НИЛ «Диабетологии»
Заочный аспирант ФМИЦ
им.В.А.Алмазова

Интерн ФМИЦ
им. В.А. Алмазова
Зав. КДЛ ЛРК1
Зав. ЦКДЛ

1-й фрагмент, цель исследования

изучение изменения устойчивости миокарда к ишемическому и реперфузионному повреждению под действием сахароснижающих препаратов: инсулина и эксенатида, препарата класса агонистов рецепторов ГПП-1 на экспериментальной модели сахарного диабета второго типа

Методы исследования

Модель сахарного диабета 2 типа.

У 40 белых крыс-самцов линии Wistar был смоделирован сахарный диабет 2 типа. В данной работе использовали модель неонатального стрептозотоцитонового СД, которая является экспериментальным аналогом СД2. СД2 был индуцирован однократной внутрибрюшинной инъекцией стрептозотоцина в дозе 65 мг/кг, растворенного в цитратном буфере (рН 5,5), на 4-5 день жизни крысятам линии Wistar [11]. Для отбора крыс в опыт производилась оценка уровня гликемии, в эксперимент включались животные с уровнем гликемии выше 7 ммоль/л. Затем животные были разделены на группы:

- группа, которой вводили инсулин за 1,5 часа до основной точки эксперимента (наложение лигатуры на коронарную артерию - моделирование острого инфаркта миокарда) в дозе 0,1 Ед/кг массы тела - группа А
- группа, которой вводили за 1,5 часа до ишемии эксенатид в дозе 140 мкг/кг – группа В .
- животные, которым вводили инсулин после окончания ишемии –группа С.
- животные которым вводили эксенатид в той же дозировке после окончания ишемии – группа D
- контрольная группа животных с СД2 – группа К

Моделирование острого инфаркта миокарда проводили через 10-12 недель после индукции СД2.

Протокол эксперимента с моделированием острого инфаркта миокарда.

0 (основная точка) – Моделирование острого инфаркта миокарда путем индукции 40-минутной глобальной ишемии (наложение лигатуры на коронарную артерию) с последующей реперфузией. В ходе эксперимента в изоволюмическом режиме регистрировали давление в левом желудочке. Программным методом получали значения следующих гемодинамических показателей: систолического, диастолического (ДДЛЖ), пульсового давления в левом желудочке (ПДЛЖ) и частоты сердечных сокращений (ЧСС).

Через 40 минут от основной точки – снятие лигатуры во всех подгруппах.

Продолжение терапии в подгруппах А и В теми же препаратами в тех же дозировках и начало терапии в подгруппах С и D препаратами: инсулина в дозе 0,1 Ед/кг массы тела (группа С) и комбинацией инсулина в той же дозе с эксцентидом в дозе 140 мкг/кг (группа D).

Через 240 минут от основной точки (180 минут от начала реперфузии и получения терапии во всех подгруппах) - проводилась морфологическая оценка размера очага ишемии путем аутопсии сердца.

Методика определения зоны инфаркта.

Изготавливались 5 срезов сердца, с обработкой образцов методикой двойного окрашивания: 1) синим Эванса 5%-1 мл в/в по окончанию реперфузии путем инъекции в бедренную вену (рисунок 1,2,5), 2) трифенилтетразолием хлоридом 1% (путем погружения срезов в термостат с температурой 37 градусов на 15 мин) (рисунок 3,4,5). Изучение размеров очагов ишемии и некроза под микроскопом. Размер инфаркта определяли планиметрическим методом.

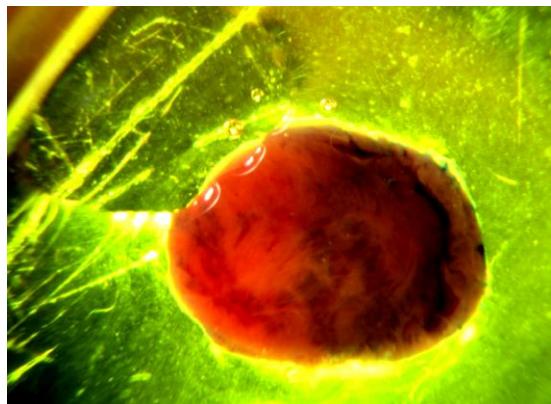


Рисунок 1. Окраска синим Эванса, светлый участок ишемии



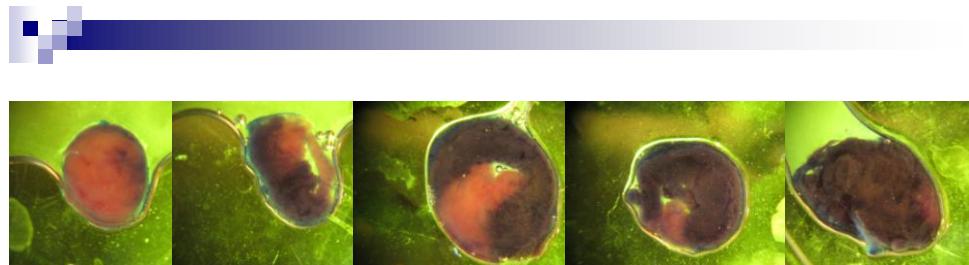
Рисунок 2. Окраска синим Эванса, выделена зона ишемии



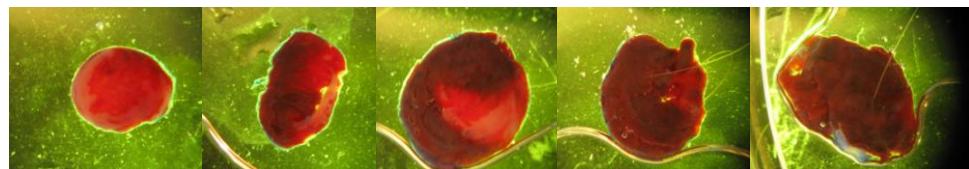
Рисунок 3. Окраска Трифенилтетразолием хлоридом



Рисунок 4. Окраска трифенилтетразолием хлоридом, выделена зона некроза



5 срезов окраска Синькой Эванса



Окраска Трифенилтетразолием

Рисунок 5. Окрашенные срезы сердца

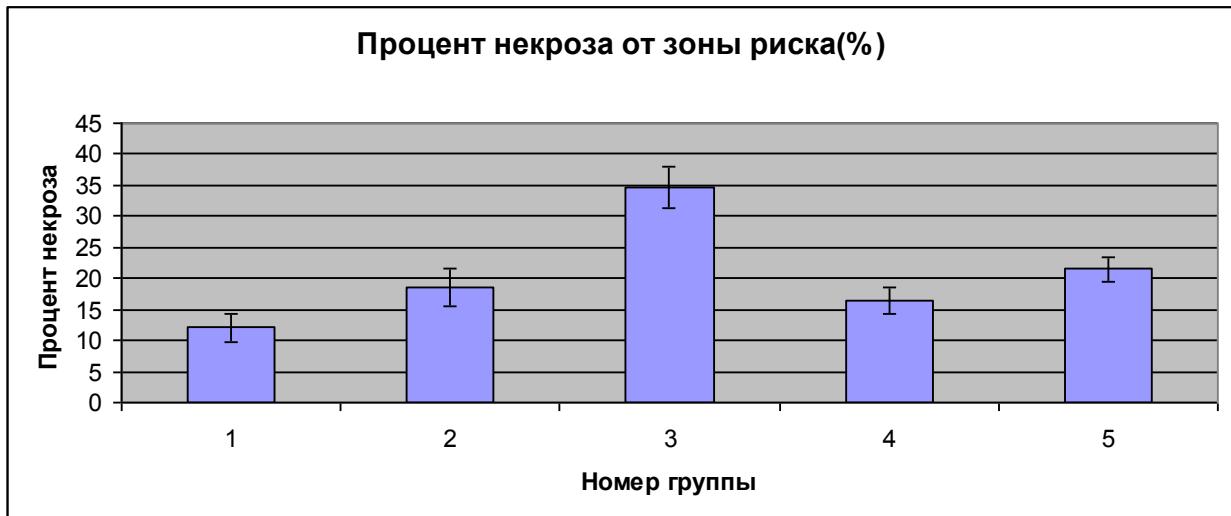
Статистическая обработка.

Достоверность различий оценивали с помощью программного пакета Statistica (ANOVA, тест Шеффе). Все функциональные данные выражались в виде «среднее ± стандартное отклонение». Различия расценивались как значимые при значениях Р менее чем 0,05.

Результаты исследования.

Размер зоны инфаркта.

Проводилась оценка соотношения зоны некроза к зоне ишемии по каждому срезу, затем высчитывался средний процент некроза по непосредственному образцу целого сердца. Потом, согласно правилам статистики, подсчитывалось среднее значение некроза в каждой группе животных (гистр.1).



Гистограмма 1. Процент некроза от зоны риска при применении разных препаратов, средние значения(%)

1- группа В- миметик ГПП-1 (эксенатид) за 1,5 часа до ишемии .

2- контрольная группа животных с СД2

3- группа А- инсулин за 1,5 часа до ишемии

4- группа С-инсулин после окончания ишемии .

5- группа D- миметик ГПП-1 (эксенатид) после окончания ишемии

Данные по размеру инфаркта в различных группах приведены в табл.1.

Таблица 1.

Процент некроза от зоны риска при применении разных препаратов,
средние значения(%)

Группы	% некроза от зоны риска
А- инсулин за 1,5 часа до ишемии	34,7±3,4*
В- эксенатид за 1,5 часа до ишемии	12,02±2,2*
С-инсулин после окончания ишемии	16,43±2,2
Д-эксенатид после окончания ишемии	21,5±2,0
К – контрольная группа	18,63±3,1

* p<0,05

Результаты данной работы свидетельствуют о том, что в использованных дозировках, пути введения и сроке терапии экзенатид не оказывал кардиопротективного эффекта при экспериментальном СД2 при применении после развития ишемии. В тоже время при начале введения препарата в период до развития ишемии было выявлено повышение устойчивости миокарда к ишемическому-реперфузионному повреждению при СД2.

Инсулин не оказывал эффект на устойчивость миокарда к ишемическому-реперфузионному повреждению при СД2. Отсутствие кардиопротективного эффекта при начале системного введения препаратов после индукции ишемии может быть связано с их недостаточным накоплением в миокарде.

Заключение

По результатам проведенных исследований не было получено достоверного повышения устойчивости миокарда к ишемии на фоне системного введения как инсулина, так и экзенатида после индукции ишемии. Между тем, при начале введения препаратов до индукции ишемии отмечалось достоверное уменьшение размера очага ишемического повреждения при введении экзенатида.

Публикации по теме НИР:

Статьи:

- 1) Кравчук Е.Н., Галагудза М.М., Гринева Е.Н., Байрамов А.А. Экспериментальные модели метаболического синдрома // Артериальная гипертензия. - 2014. - Т. 20. - № 5. - С. 78-84

Доклады

- 1) Кравчук Е.Н. (Санкт-Петербург). Влияние метформина на устойчивость миокарда к ишемии при сахарном диабете 2 типа. Секционное заседание «Плеотропные эффекты сахароснижающих препаратов — трансляционные исследования» Всероссийской научно-практической конференции с

международным участием «Трансляционные исследования в инновационном развитии здравоохранения» 17 мая 2014 года, Санкт-Петербург

- 2) Зыков В.А., Тучина Т.П. доклад «Возможности оптимизации ведения острого коронарного синдрома при сахарном диабете — результаты экспериментального исследования» Секционное заседание «Плеотропные эффекты сахароснижающих препаратов — трансляционные исследования» Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Трансляционные исследования в инновационном развитии здравоохранения» 17 мая 2014 года, Санкт-Петербург
- 3) Постерный доклад на 74th Scientific Sessions ADA 13-17 June 2014, San Francisco, CA, USA "The Effect of Metformin on Cardioprotection and AMPK Activity in Experimental Model of Type 2 Diabetes Mellitus" 467-P - 2014

2-й фрагмент. Цель исследования: изучить влияние метформина, вилдаглиптина и их комбинации на морфофункциональное состояние почек крыс при экспериментальном сахарном диабете.

Материалы и методы:

Для исследования потенциальных ренопротективных свойств сахароснижающих препаратов на нефрэктомированных самцах крыс стока Wistar моделировали сахарный диабет с абсолютной инсулинопенией (посредством введения половозрелым особям внутрибрюшинно стрептозотоцина в дозе 60 мг/кг) и сахарный диабет 2 типа (предварительно содержали крыс в течение 5 нед. на высокожировом питании с последующим введением внутрибрюшинно с интервалом в 15 мин. никотинамида 230 мг/кг и стрептозотоцина 65 мг/кг). Через 8 нед. после манифестации заболевания на 2 месяца ежедневно перорально назначались исследуемые препараты (метформин в дозе 300 мг/кг (группа М),

вилдаглиптина в дозе 8 мг/кг (группа В) и их комбинация (группа М+В). По завершении эксперимента крысы помещались на 24 ч. в метаболическую камеру для сбора мочи с целью исследования суточной экскреции альбумина (ИФА-наборы фирмы AssayPro, США), молекулы повреждения почек-1 (КИМ-1, ИФА-наборы фирмы Abcam, США) и ассоциированного с нейтрофильной желатиназой липокалина (NGAL). Креатинин мочи и сыворотки (с последующим расчётом клиренса креатинина), мочевину, холестерин, триглицериды, уровень инсулина в плазме определяли на биохимическом анализаторе Cobas Integra 400 plus (США) с использованием коммерческих наборов фирмы Roche (Германия), гликированный гемоглобин исследовали методом ВЭЖХ на анализаторе BioRad D10, США. Выполнялась светооптическая микроскопия почечной ткани (с окраской гематоксилином и эозином, трихромным окрашиванием по Массону), выполнялся полуколичественный морфометрический анализ с определением индекса гломерулосклероза в каждом клубочке в баллах от 1 до 4, затем в каждой почке высчитывался средний балл. Также осуществляли подготовку почечной ткани к трансмиссионной электронной микроскопии с предварительной перфузационной фиксацией материала в 3% глутаральдегиде.

Результаты:

У крыс с выраженной инсулинопенией все исследуемые препараты значимо уменьшали уровень креатинина сыворотки (ммоль/л, группа В=66,6±1,5, группа М=69,2±2,1, группа В+М =56,4±3,7; группа Плацебо=87,7±2,3, $p <0,05$ для всех). Однако, только в группах животных, получавших вилдаглиптин, наблюдалось достоверное улучшение клиренса креатинина (мл/мин/кг, группа В=2,6±0,1; группа В+М = 2,69±0,16) и значимое уменьшение уровня экскреции альбумина с мочой (мг/сут, группа В=10,5±1,07; группа В+М=6,7±0,47) по сравнению с группой Плацебо(1,7±0,11 и 26,9±2,0, соответственно) – см. рисунок 1 а,б. Кроме

того, нефропротективные свойства вилдаглиптина и его комбинации с метформином подтвердились при морфологическом исследовании, не выявившем специфических диабетических изменений в обозначенных экспериментальных группах, наблюдавшихся у крыс, не получавших лечения (см. рисунок 2 а, б). Несмотря на то, что терапия метформином не уменьшал уровень рутинных маркеров почечной дисфункции у таких животных, в основном эксперименте на модели сахарного диабета 2 типа метформин продемонстрировал способность значительно снижать уровень маркеров повреждения проксимальных канальцев почек ($KIM-1 = 589 \pm 93,3$ нг/мл и $NGAL (1544,9 \pm 100,6$ пг/мл) по сравнению с крысами, не получавшими лечения (группа Плацебо, $1097 \pm 91,1$ нг/мл; $1918,6 \pm 118,1$ пг/мл, соответственно), $P \leq 0,05$).

Выводы:

- 1) у нефрэктомированных крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом монотерапия вилдаглиптином, а также комбинация вилдаглиптина с метформином, независимо от сахароснижающего действия, достоверно уменьшала уровень рутинных маркеров повреждения почек и выраженность морфологических диабетических изменений, что может указывать на нефропротективные эффекты такого лечения;
- 2) на нефрэктомированных крысах, получавших высокожировое питание, с никотинамид-стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом показано, что метформин, значительно снижая уровень маркеров канальцевой дисфункции, продемонстрировал тубулопротекторные свойства.

Рисунок 1 (а). Уровень экскреции альбумина с мочой в исследуемых группах крыс с выраженной инсулинопенией по окончании эксперимента.

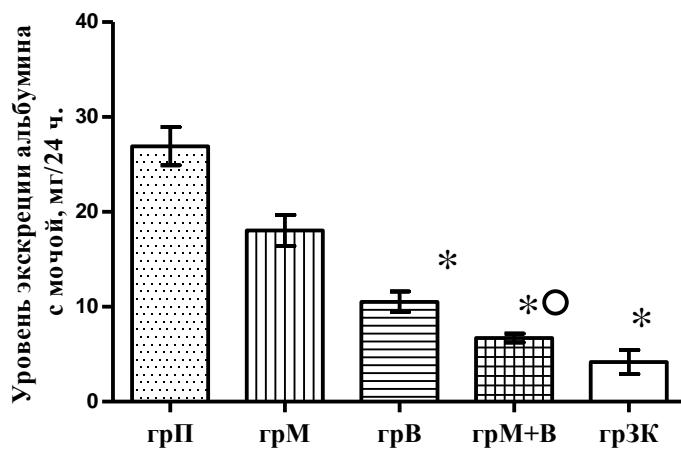
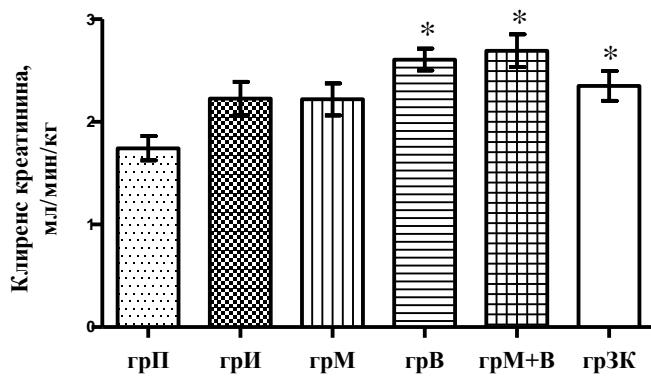
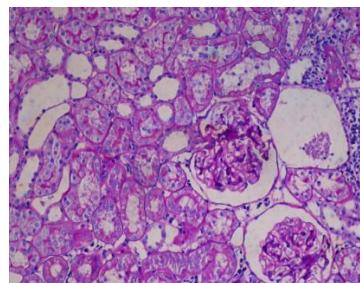


Рисунок 1 (б). Клиренс креатинина в исследуемых группах крыс с выраженной инсулинопенией по окончании эксперимента.

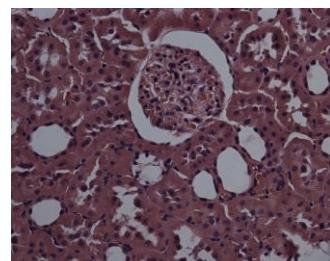


Сокращения: грП – группа Плацебо; грМ – группа Метформина; грВ – группа Вилдаглиптина; грМ+В – группа комбинированного лечения; грЗК – группа здорового контроля (геминефрэктомированные крысы без диабета). * $P \leq 0,05$ в сравнении с группой Плацебо; ○ $P \geq 0,05$ в сравнении с группой Здорового контроля.

Рисунок 2. Морфологические изменения почечной ткани (а – группа Плацебо, б – группа Вилдаглиптина).



а. Светооптическая микроскопия, ШИК-окраска, ×200. Экспансия мезангиального матрикса, мезангиальная гиперклеточность. Очаговые отложения ШИК-позитивного вещества в мезангиальном матриксе.



б. Светооптическая микроскопия, ШИК-окраска, ×200. Отсутствие диабетических изменений.

Публикации по теме НИР

Статьи:

- 1) Гринева Е.Н., Кравчук Е.Н. Новые технологии в профилактике и лечении сахарного диабета 1 типа // Трансляционная медицина. - в печати

Тезисы докладов:

1. V. Bayrasheva, E. Grineva, A. Babenko, M. Galagudza, S. Chefu, Y. Dmitriev, A. Bairamov. Vildagliptin alone, and in half-dose combination with metformin, attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in high-fat fed heminephrectomized rats.// Endocrine Abstracts book, May 2014; Vol. 35, p. 43.

2. Bayrasheva V., Grineva E., Babenko A., Galagudza M., Chefu S., Bairamov A. Dmitriev Yu. Metformin in combination with vildagliptin, but not metformin alone, attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in uninephrectomized rats. *Diabetic technologies & therapeutics*, 2014; vol.16, supp.1, p.257. Impact Factor (JCR 2012) = 2,205
3. Байрашева В.К., Дмитриев Ю.В., Чефу С.Г., Гринева Е.Н., Бабенко А.Ю. Нефропротективные свойства ингибитора ДПП-4 при экспериментальной диабетической нефропатии.// Сборник тезисов докладов Юбилейной XX всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии-2014», 9-10 апреля 2014 Санкт – Петербург, Россия, С. 21.
4. Байрашева В.К., Гринева Е.Н., Бабенко А.Ю., Чефу С.Г., Байрамов А.А. Ренопротективные свойства вилдаглиптина и его комбинации с метформином при экспериментальной диабетической нефропатии. //Трансляционная медицина, № 1, май 2014 г., С. 5-6.
5. Байрашева В.К., Гринева Е.Н., Бабенко А.Ю., Галагудза М.М., Чефу С.Г., Байрамов А.А., Дмитриев Ю.В. Нефропротективные свойства комбинации метформина и вилдаглиптина на модели диабетической нефропатии у крыс. Сборник тезисов докладов V международного молодежного медицинского конгресса “Санкт -Петербургские научные чтения-2013”, 4-6 декабря 2013 .стр. 215-216.

Информация об участии в конференциях и конгрессах по теме НИР:

1) Устный доклад на Европейском Конгрессе эндокринологов, Польша, 3-7 мая 2014 (16th European Congress of Endocrinology Poland, Wrocław 03 May 2014 - 07 May 2014. «Vildagliptin alone, and in half-dose combination with metformin, attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in high-fat fed heminephrectomized rats»Valentina Bayrasheva, Elena Grineva, Alina Babenko, Michael Galagudza, Svetlana Chefu, Yuri Dmitriev & Alekber Bairamov.

2)Устный доклад на Юбилейной XX всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии-2014», 9-10 апреля 2014 Санкт – Петербург, Россия. «Нефропротективные свойства ингибитора ДПП-4 при экспериментальной диабетической нефропатии». Байрашева В.К., Дмитриев Ю.В., Чефу С.Г., Гринева Е.Н., Бабенко А.Ю.

3)Постерный доклад на 7th International Conference on Advanced Technologies & Treatments for Diabetes, 5-8 февраля 2014 Вена, Австрия. Metformin in combination with vildagliptin, but not metformin alone, attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in uninephrectomized rats. Bayrasheva V. Grineva E. Babenko A. Galagudza M. Chefu S. Bairamov A. Dmitriev Yu.

4)Постерный доклад на V международном молодежном медицинском конгрессе “Санкт -Петербургские научные чтения-2013”, 4-6 декабря 2013 . Байрашева В.К., Гринева Е.Н., Бабенко А.Ю., Галагудза М.М., Чефу С.Г., Байрамов А.А., Дмитриев Ю.В. «Нефропротективные свойства комбинации метформина и вилдаглиптина на модели диабетической нефропатии у крыс», сборник тезисов докладов стр. 215-216.