

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри супрамолекулярної хімії

проф. Рябухін Сергій Вікторович

Протокол №___ засідання кафедри

від «___» _____ 2023 р.

IN SILICO ДОСЛІДЖЕННЯ ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ N-АЦИЛЕТАНОЛАМІНІВ В ЯКОСТІ АНТИДІАБЕТИЧНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ЯК АГОНІСТІВ GPR40 МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКІНГУ

Випускна кваліфікаційна робота магістра

за спеціальністю 102 Хімія

ОП «Хемоінформатика»

Романенко Катерини Сергіївни

Науковий керівник від кафедри

доцент кафедри супрамолекулярної хімії

к.х.н. Гринь Світлана Валеріївна

Робота виконана у відділі біохімії ліпідів

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

під керівництвом ст. н. с. відділу,

к.б.н. Бердишева Андрія Геннадійовича

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р.

АНОТАЦІЯ

Випускна кваліфікаційна робота магістра: 59 сторінок, 8 рисунків, 2 таблиці, 94 джерела.

Об'єкт досліджень – Здатність N-ацилетаноламінів (NAEs) до зв'язування з рецептором GPR40.

Мета роботи – Вивчення перспектив використання N-ацилетаноламінів як агоністів протеїну GPR40 в лікуванні діабету 2 типу.

Методи дослідження – молекулярний докінг.

Застосування методу молекулярного докінгу дозволило показати, що ряд сполук NAEs здатні зв'язуватися з активним центром протеїну GPR40, причому тільки насичений C18:0 NAE – N-стеароїлетаноламін – виявив найкращу афінність до цього рецептора. Це може вказувати на їх можливу роль у регуляції глюкозового обміну та контролі рівня цукру в крові *in vivo*. Отримані результати докінг-аналізу вказують на потенційну перспективу використання N-ацилетаноламінів як антидіабетичних засобів.

Результати цієї роботи розширюють наше розуміння біохімічних механізмів антидіабетичної дії NAEs. Отримані результати можуть послужити основою для подальшого експериментального та клінічного дослідження N-ацилетаноламінів як потенційних безпечних антидіабетичних засобів. Отримані дані можуть служити підґрунтям для створення нових терапевтичних підходів для лікування діабету 2 типу.

Ключові слова: ДІАБЕТ 2 ТИПУ, GPR40, N-АЦИЛЕТАНОЛАМІНИ, N-СТЕАРОЇЛЕТАНОЛАМІН, АГОНІСТИ, МОЛЕКУЛЯРНИЙ ДОКІНГ, АНТИДІАБЕТИЧНІ ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ, ЖИРНІ КИСЛОТИ.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

2-AG	–	2-Арахідоноїлгліцерин
ANA	–	N-арахідоноїлетаноламін, анандамід
CB	–	канабіноїдний рецептор
FFA	–	вільні жирні кислоти
GLP-1	–	глюкагоноподібний пептид-1
GPCR	–	рецептори, пов'язані з G-білком
NAE	–	N-ацилетаноламіни;
NOE	–	N-олеоїлетаноламін
NPE	–	N-пальмітоїлетаноламін
NSE	–	N-стеароїлетаноламін;
PPAR	–	рецептори, що активуються проліфератором пероксисом
SA	–	Стеаринова кислота
AK	–	амінокислота
K _i	–	константа інгібування
HBE ₃	–	найменша вільна енергія зв'язування
OL	–	острівці Лангергансу

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	9
1.1 Патофізіологія діабету та шляхи його лікування.....	9
1.1.1 Механізми регуляції секреції інсуліну з β -клітин в острівцях Лангерганса.....	10
1.1.2 Фактори, що сприяють розвитку діабету 2 типу.....	11
1.1.3 Методи лікування та профілактики діабету 2 типу.....	12
1.2 Жирні кислоти та модуляція вивільнення інсуліну.....	15
1.3 GPR40 як терапевтична мішень для лікування діабету 2 типу.....	16
1.3.1 Біологічна функція GPR40.....	16
1.3.2 Роль G-білок-зв'язаних рецепторів та жирних кислот в посиленні секрецію інсуліну.....	18
1.3.3 Чи існує потенціал несприятливих наслідків тривалої стимуляції GPR40.....	19
1.3.4 Фармакологія <i>in vivo</i> агоністів GPR40 на моделях гризунів	21
1.3.5 Дослідження на людях з агоністом GPR40 TAK-875	22
1.4 Огляд N-ацилетаноламінів як потенційних антидіабетичних лікарських засобів та їх механізмів дії.....	24
1.4.1 Роль N-ацилетаноламінів у регуляції рівня глюкози в крові та вплив на інсулінорезистентність.....	26
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	29
2.1 Конструювання лігандів.....	29
2.2 Молекулярний докінг.....	29
2.3 Визначення константи інгібування ліганду.....	30
2.4 Визначення амінокислотних залишків, що беруть участь у взаємодії ліганда з рецептором.....	30
2.5 Визначення водневих зв'язків, що беруть участь у взаємодії ліганда з рецептором.....	31

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	33
3.1 Аналіз ефективності зв'язування досліджуваних NAEs з рецептором GPR40.....	33
3.2 Аналіз отриманих значень константи інгібування досліджуваних NAEs.....	41
3.3 Амінокислотні залишки GPR40, що беруть участь у зв'язуванні NAEs.....	42
3.4 Дослідження утворення водневих зв'язків при взаємодії NSE з активним центром рецептору GPR40.....	43
ВИСНОВКИ.....	47
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	48

ВСТУП

Метаболічні захворювання можуть бути класифіковані як вроджені (спричинені спадковою аномалією ферментів) або набуті (спричинені захворюванням ендокринного органу або порушенням метаболічно важливим органом, таким як печінка або підшлункова залоза). Цукровий діабет – метаболічне захворювання, яке визначається як хронічна гіперглікемія, пов'язана із супутніми ураженнями органів і порушеннями обмінних процесів. Цукровий діабет 1 типу (він же інсулінозалежний цукровий діабет) є поширеним захворюванням у молодих людей віком до 20 років. Вважається, що це спричинено аутоімунним захворюванням, яке призводить до інсуліту і подальшого руйнування бета-клітин острівців Лангерганса, що відповідають за синтез інсуліну. Це спричиняє низьку продукцію інсуліну і призводить до підвищення рівня глюкози в крові (гіперглікемія). Цукровий діабет 2 типу часто трапляється у літніх людей. Це пов'язано з резистентністю до інсуліну в печінці та скелетних м'язах, а також із дефектами клітин острівців Лангерганса. Підвищений рівень глюкози в крові (а також високий рівень ліпідів у крові) у хворих на цукровий діабет може призводити до порушення функцій бета-клітин і посилення процесів апоптозу в бета-клітин.

Сучасні протидіабетичні препарати слабо контролюють рівень цукру в крові й не можуть запобігти виникненню високого чи низького рівня цукру в крові. Широкі коливання рівня цукру в крові чинять токсичний вплив і можуть спричиняти довгострокові ускладнення у пацієнтів з діабетом, такі як ретинопатія, ренопатія, невропатія і захворювання периферичних судин. Крім того, пацієнти з діабетом схильні до ризику інших супутніх станів, таких як ожиріння, гіпертонія, інсульт, хвороби серця і гіперліпідемія.

Метаболічний синдром – це термін, який відноситься до групи з п'яти чинників ризику, а саме: абдомінальне ожиріння, високий рівень тригліцеридів, високий кров'яний тиск, високий рівень цукру в крові та низький рівень ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ). Відомо, що ці фактори підвищують

ризик виникнення діабету 2 типу та серцево-судинних захворювань. У пацієнта, який страждає щонайменше трьома з цих чинників, діагностується метаболічний синдром. Контроль рівнів ліпідів і глюкози в крові є невід'ємною частиною лікування цукрового діабету 2 типу, серцевих захворювань і факторів ризику метаболічного синдрому.

За сучасними уявленнями, велику роль у регуляції процесів метаболізму глюкози відіграє особливий рецептор GPR40 [1], також званий рецептором 1 вільних жирних кислот (FAA1). Він являє собою рецептор клітинної поверхні і є членом надродини рецепторів, пов'язаних з G-білком (GPCR). Уперше він був ідентифікований як рецептор-сирота (рецептор без відомого ліганда). GPR40 у високому ступені експресується в бета-клітинах підшлункової залози і клітинних лініях, що секретують інсулін. Він також експресується в ендокринних клітинах, смакових клітинах, імунних клітинах, спленоцитах і головному мозку.

Ендогенні ліганди для GPR40 переважно являють собою жирні кислоти. GPR40 активується, зокрема, довголанцюговими жирними кислотами, особливо олеїною кислотою. Активація GPR40 пов'язана насамперед із модуляцією сімейства Gq внутрішньоклітинних сигнальних G-білків і супутньою індукцією підвищених внутрішньоклітинних рівнів кальцію.

Відомо, що активація рецепторів GPR40 жирними кислотами в клітинах, що секретують інсулін, викликає підвищення рівня інсуліну в плазмі. Тобто, агоністи GPR40 потенційно можуть забезпечити лікування діабету 2 типу за рахунок збільшення вивільнення інсуліну. Крім того, використання агоністів GPR40 потенційно може відновити та/або зберегти функції бета-клітин острівців Лангергансу (ОЛ); отже, вони можуть бути корисними для затримки або запобігання зменшенню та втраті функцій острівців у пацієнтів із діабетом 2 типу. Це явна перевага перед сучасними препаратами для лікування діабету 2 типу, які можуть спричиняти поступову втрату активності острівців порівняно з тривалим використанням, що зрештою при-

зводить до залежності пацієнтів від щоденних ін'єкцій інсуліну для контролю рівня цукру в крові.

Молекулярне моделювання та докінг аналіз є потужними інструментами, що дозволяють вивчати взаємодію лігандів з білками та прогнозувати їх активність. Один з потенційних молекулярних мішеней для лікування діабету 2 типу є протеїн GPR40, який відіграє важливу роль у регуляції глюкозового обміну. Дослідження взаємодії N-ацилетаноламінів з GPR40 методом молекулярного докінгу може виявитись перспективним у пошуку нових антидіабетичних засобів.

Метою цієї дипломної роботи є проведення *in silico* досліджень взаємодії декотрих N-ацилетаноламінів з протеїном GPR40 за допомогою методу молекулярного докінгу та оцінка можливості їх використання як антидіабетичних лікарських засобів. Для досягнення цієї мети було визначено такі завдання:

1. Проаналізувати літературні дані щодо ролі GPR40 в розвитку діабету 2 типу та можливості використання N-ацилетаноламінів як агоністів рецептору GPR40.
2. Застосувати програмний пакет AutoDockTools для проведення докінгу різних N-ацилетаноламінів з GPR40.
3. Оцінити енергетичні та просторові параметри взаємодії між N-ацилетаноламінами та GPR40 для визначення їх потенціалу як лігандів GPR40.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Патолофізіологія діабету та шляхи його лікування

Цукровий діабет є хронічним захворюванням, що пов'язане з порушенням метаболізму глюкози та втратою функції бета-клітин підшлункової залози. Це призводить до зниження вироблення інсуліну та/або зменшення його ефективності в периферичних тканинах [2].

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (WHO), у світі близько 422 мільйонів дорослих людей мають діабет, з яких більшість - близько 90-95% - страждає від діабету 2 типу. За прогнозами, ця цифра продовжуватиме зростати і досягне 552 мільйонів у 2030 році.

У 2019 році було зафіксовано понад 1,5 мільйона смертей від діабету 2 типу у всьому світі. Це становить близько 10% від загальної кількості смертей серед дорослих людей [3].

У цукровому діабеті 1 типу, який становить 5-10% від загальної кількості випадків діабету, відбувається руйнування бета-клітин підшлункової залози, що призводить до абсолютного дефіциту інсуліну [4]. Це зазвичай спричинюється автоімунними реакціями, в результаті яких імунна система організму атакує та знищує власні клітини підшлункової залози [5]. У діабеті 1 типу висока концентрація глюкози в крові веде до гліколізу та синтезу амінокислот, що призводить до зниження концентрації аденозинтрифосфату (АТФ) в клітинах. Це може спричинити зниження синтезу білків та ліпідів, а також стимулювати глікогеноліз та кетонівий синтез [2].

У цукровому діабеті 2 типу, який становить більш як 90% випадків діабету, відбувається зниження ефективності інсуліну в периферичних тканинах, що може бути пов'язане з інсулінорезистентністю та порушенням секреції інсуліну. Інсулінорезистентність виникає, коли клітини стають менш чутливими до інсуліну, що змушує підшлункову залозу виробляти більше інсу-

ліну, щоб забезпечити нормальний рівень глюкози в крові. Проте з часом бета-клітини підшлункової залози можуть виснажитися і перестати виробляти достатню кількість інсуліну, що призводить до розвитку гіперглікемії [6].

Окрім цього, в діабеті 2 типу також спостерігається зниження продукції інкретинових гормонів, таких як GLP-1 (глюкагоноподібний пептид-1) і GIP (глюкозозалежний інсулінотропний пептид). Ці гормони стимулюють продукцію інсуліну та знижують рівень глюкози в крові. Зниження продукції інкретинових гормонів може призвести до збільшення рівня цукру в крові та сприяти розвитку діабету 2 типу [7].

Порушення метаболізму глюкози в діабеті може також призвести до пошкодження кровоносних судин, що може привести до розвитку серцево-судинних захворювань та інших ускладнень. Додатково, діабет 2 типу часто супроводжується гіпертензією, дисліпідемією, атеросклерозом та іншими серцево-судинними захворюваннями, що є головною причиною смертності серед пацієнтів з діабетом.

1.1.1 Механізми регуляції секреції інсуліну з β -клітин в острівцях Лангерганса

β -С-клітини в острівцях Лангерганса виділяють інсулін у відповідь на підвищення рівня глюкози в крові. Різде підвищення рівня глюкози викликає швидке вивільнення інсуліну, яке підтримується протягом короткого періоду, позначеного як фаза 1, за яким слідує тривалий період нижчої секреції (фаза 2), на який припадає більша частина секреції інсуліну. Прогресуюче зменшення маси β -клітин або секреторної здатності викликає аномалії метаболізму глюкози, що призводить до діабету та його ускладнень [8].

Секреція інсуліну з β -клітин в основному контролюється через поглинання та метаболізм глюкози, що призводить до швидкого збільшення співвідношення АТФ до АДФ і закриття каналу K_{ATP} із деполяризацією мембрани через інгібування потоку K^+ . Це призводить до активації залежного від

напруги кальцієвого каналу з надходженням кальцію та злиттям гранул, що містять інсулін, і вивільненням інсуліну. Цей базальний механізм головним чином відповідає за швидку першу фазу секреції інсуліну. Піруват, отриманий з глюкози, також може входити в цикл трикарбонових кислот через піруватдегідрогеназу (PDH) і піруваткарбоксилазу, які можуть впливати на секрецію інсуліну шляхом підвищення рівня сигнальних молекул, отриманих від катаплерозу, таких як оксалоацетат, цитрат, глутамат і NADPH [9]. Додаткові харчові та нехарчові фактори, включаючи цАМФ, амінокислоти та жирні кислоти, можуть прямо чи опосередковано модулювати секрецію інсуліну [10].

1.1.2 Фактори, що сприяють розвитку діабету 2 типу

Згідно з дослідженнями, існує декілька факторів, які можуть сприяти розвитку діабету 2 типу.

1. Надмірна вага або ожиріння: Епідеміологічні дослідження підтверджують, що наявність надмірної ваги або ожиріння є одним з найбільших ризикових факторів для розвитку діабету 2 типу. Це пов'язано з тим, що відносна інсулінорезистентність збільшується зі збільшенням маси тіла та жирової тканини [11].

2. Неправильне харчування: Згідно з дослідженнями, дієта, багата вуглеводами та насиченими жирними кислотами, може збільшувати ризик розвитку діабету 2 типу. Натомість, дієта, багата рослинними продуктами, білками та ненасиченими жирними кислотами, може знижувати ризик розвитку цього захворювання [12].

3. Недостатня фізична активність: Низький рівень фізичної активності також може сприяти розвитку діабету 2 типу. Дослідження показали, що збільшення рівня фізичної активності може покращити чутливість клітин до інсуліну та знизити ризик розвитку діабету 2 типу [13].

4. Генетична схильність: Генетична схильність також може впливати на ризик розвитку діабету 2 типу. Люди з родинною історією цього захворювання мають більший ризик його розвитку [14].

5. Вік: Ризик розвитку діабету 2 типу збільшується зі зростанням віку.

Вік є одним з найважливіших факторів ризику розвитку діабету 2 типу [15]. За даними досліджень, з віком зменшується чутливість тканин до інсуліну, що може призвести до розвитку інсулінорезистентності та діабету 2 типу. Це пояснюється тим, що зі зростанням віку збільшується вміст жирової тканини, зокрема в брюшній порожнині, що може сприяти розвитку інсулінорезистентності. Крім того, зі зростанням віку може відбуватися погіршення функції підшлункової залози, що відповідає за вироблення інсуліну.

1.1.3 Методи лікування та профілактики діабету 2 типу

Наукові дослідження показали, що ризик розвитку діабету 2 типу збільшується більше, ніж удвічі, кожні десять років після 40 років [16]. З іншого боку, за даними досліджень, раннє виявлення інсулінорезистентності та діабету 2 типу та раннє введення необхідних заходів може знизити ризик розвитку ускладнень та поліпшити прогноз хвороби [17].

Основними методами лікування діабету є збільшення чутливості клітин до інсуліну, стимулювання вироблення інсуліну та зниження рівня глюкози в крові [18].

Основні методи лікування включають зміну стилю життя, дієту, фізичну активність та лікування медикаментами. Важливим елементом зміни стилю життя є збільшення фізичної активності та зменшення ваги. Регулярна фізична активність зменшує інсулінорезистентність, допомагає знизити глюкозу в крові та знижує ризик розвитку серцево-судинних захворювань. Дієта повинна бути багата на овочі, фрукти, злаки та білкові продукти. Варто уникати продуктів з високим вмістом цукру та жирів.

Якщо зміна стилю життя не призводить до достатнього контролю глюкози в крові, лікар може призначити медикаментозне лікування. Ліки націлені на зниження рівня глюкози в крові, поліпшення інсулінорезистентності та запобігання ускладнень. До найбільш часто використовуваних ліків належать метформін, сульфонілуреї та тіазолідиндіони [19].

Діабет 2 типу можна лікувати різними способами, включаючи зміни в стилі життя, пероральні препарати, ін'єкційні ліки та інші методи.

Основною метою змін в стилі життя є контроль рівня глюкози в крові, зменшення ваги та поліпшення фізичної активності. В цьому допоможуть збалансована дієта, зменшення кількості вживаного алкоголю та здійснення регулярних фізичних вправ. Дослідження показали, що збалансована дієта з низьким вмістом вуглеводів та насичених жирів може підвищити чутливість до інсуліну та зменшити ризик розвитку ускладнень діабету 2 типу [20].

Пероральні препарати включають метформін, сульфонілуреї та тіазолідиндіони. Метформін є першим рядком терапії та допомагає знизити рівень глюкози в крові, зменшити інсулінорезистентність та знизити ризик розвитку серцево-судинних ускладнень [21]. Сульфонілуреї та тіазолідиндіони також можуть знизити рівень глюкози в крові, але мають ризик побічних ефектів, таких як гіпоглікемія та збільшення ваги.

Ін'єкційні ліки включають інсулін та інгібітори ДПП-4 (діпептидилпептидаза-4). Інсулін зменшує рівень глюкози в крові та може бути призначений як монотерапія або в комбінації з іншими ліками. Інгібітори ДПП-4 зменшують рівень глюкози в крові, підвищують синтез інкретин та збільшують відчуття ситості після їжі.

Для пацієнтів, які мають високий ризик серцево-судинних ускладнень, рекомендовано використання інгібіторів SGLT2 та GLP-1 [22]. Ці препарати не тільки знижують рівень глікемії, але й мають кардіопротективний та нефропротективний ефекти.

Нарешті, для тяжких випадків діабету 2 типу з високими рівнями глікемії, призначається гастроінтестинальний обхідний шлях (bariatric surgery). Цей метод не тільки зменшує вагу, але й має значний ефект на глюкозу та інші метаболічні показники [23].

Крім того, останнім часом активно досліджуються нові класи лікарських засобів, зокрема агоністи GPR40, які здатні стимулювати секрецію інсуліну та підтримувати нормальний рівень глюкози в крові.

Згідно з дослідженням "In silico дослідження перспективи використання N-ацилетаноламінів в якості антидіабетичних лікарських засобів як агоністів протеїну GPR40 методом молекулярного докінгу та динаміки" [24], N-ацилетаноламіни можуть бути перспективними антидіабетичними лікарськими засобами як агоністи протеїну GPR40. Окрім того, інші дослідження також зосереджуються на розробці нових класів антидіабетичних лікарських засобів.

Наприклад, дослідження [25] розглядає нові перспективні підходи до лікування діабету, такі як застосування наночастинок та генної терапії. Зокрема, використання наночастинок може поліпшити доставку лікарських засобів до клітин, що може допомогти знизити дозу ліків та запобігти побічним ефектам.

Дослідження [26] зосереджується на розробці нових лікарських засобів на основі природних речовин. Зокрема, автори дослідження вивчають можливість використання рослинних екстрактів, які мають антиоксидантні властивості та здатні знизити рівень глюкози в крові.

Отже, дослідження у галузі розробки нових антидіабетичних лікарських засобів триває, і це може привести до винайдення більш ефективних та безпечних методів лікування діабету.

1.2 Жирині кислоти та модуляція вивільнення інсуліну

Жирині кислоти відіграють складну роль у фізіології секреції інсуліну, а також беруть участь у порушенні функції та маси β -клітин, що призводить до діабету 2 типу. Вплив жирної кислоти на β -клітини *in vitro* та *in vivo* має двофазний ефект. Вплив жирних кислот не стимулює вивільнення інсуліну; скоріше, жирині кислоти здатні залежно від дози збільшувати кількість інсуліну, що секретується під впливом підвищених концентрацій глюкози. Крім того, жирині кислоти важливі для підтримки нормальної секреції інсуліну [8]. Було показано, що зниження рівня жирних кислот у голодних щурів шляхом інгібування ліполізу нікотиновою кислотою значно зменшує подальшу секрецію інсуліну, стимульовану глюкозою. Підвищення рівня циркулюючих жирних кислот помітно збільшило вивільнення інсуліну другої фази [27]. Навпаки, хронічний вплив підвищеного вмісту жирних кислот має шкідливий вплив на функцію β -клітин із підвищенням базальної секреції інсуліну, але зниженим стимульованим вивільненням глюкози. Крім того, жирині кислоти можуть призвести до значного зниження секреції інсуліну в результаті загибелі β -клітин [28] або потенційної дедиференціації β -клітин [29], що призводить до розвитку діабету 2 типу.

Окислення жирних кислот не потрібне для посилення секреції інсуліну, оскільки інгібування карнітинпальматоїлтрансферази-1 (CPT-1), відповідальної за імпорту жирних кислот [30] у мітохондрії для окислення, призводить до посилення стимульованої глюкозою секреції інсуліну в клітинах, оброблених пальмітатом. Модель довголанцюгового ацил-КоА (LC-КоА) стимульованої глюкозою секреції інсуліну передбачає, що цитоплазматичний малоніл-КоА, отриманий із підвищених рівнів цитрату після впливу глюкози, пригнічує CPT-1, пригнічуючи поглинання LC-КоА та окислення жирних кислот, що призводить до підвищення цитоплазматичних рівнів LC-СоА [31]. Важливість LC-СоА для посилення секреції інсуліну підкреслюється дослідженнями, які показують, що зниження LC-СоА через посилений катаболізм або ін-

гібування утворення LC-CoA інгібуванням триаксин-С синтази ацил-CoA усуває здатність жирних кислот для посилення секреції інсуліну [32].

LC-CoA мають різноманітні метаболічні долі, але самі по собі можуть функціонувати як метаболічні регулятори та сигнальні молекули. Було запропоновано, що LC-CoA модулюють активність K_{ATP} . Деякі дослідження показали, що LC-CoA активують K_{ATP} [33], тоді як інші припускають, що зниження концентрації LC-CoA посилює закриття K_{ATP} -каналів [34], посилюючи деполяризацію мембрани. Утворення фосфатидної кислоти та діацилгліцеринів також може бути важливим кінцевим продуктом метаболізму LC-CoA, який бере участь у стимульованій глюкозою секреції інсуліну. Рівень діацилгліцерину підвищується після впливу глюкози, що, у свою чергу, може активувати протеїнкіназу C, а також модулювати білки на секреторних гранулах інсуліну, обидва з яких, як було показано, покращують секрецію інсуліну [35].

1.3 GPR40 як терапевтична мішень для лікування діабету 2 типу

1.3.1 Біологічна функція GPR40

Стимуляція секреції інсуліну глюкозою може регулюватися кількома поживними, гормональними та фармакологічними факторами. Жирні кислоти потенціюють секрецію інсуліну через утворення внутрішньоклітинних сигнальних молекул і через активацію рецепторів клітинної поверхні. Для GPR40, також відомий як рецептор 1 вільної жирної кислоти (FFAR1), було виявлено функцію у 2003 році як рецептора FFAs (як насичених, так і ненасичених) із середнім і довгим ланцюгами [36]. Було виявлено, що GPR40 є важливим компонентом у посиленні жирними кислотами секреції інсуліну. GPR40 сильно експресується в β -клітинах підшлункової залози, а також, хоча й меншою мірою, в інших тканинах, включаючи кишковий тракт, кісткові клітини, епітеліальні клітини легень, мозок і моноцити [37, 38]. Добре задо-

кументована функція GPR40 полягає в опосередкуванні ефектів FFAs, таких як лінолева кислота та ліноленова кислота, на стимульовану глюкозою секрецію інсуліну в β -клітинах підшлункової залози [39]. Втрата функції GPR40 через siRNA (мала інтерферуюча РНК) в β -клітинах [40] або делеція гена у мишей $Gpr40^{-/-}$ [41] послідовно призводили до значного зниження секреції інсуліну, індукованої FFAs. Навпаки, трансгенна надекспресія GPR40 запобігала розвитку гіперглікемії у мишей, яких годували дієтою з високим вмістом жирів, і покращувала секрецію інсуліну та толерантність до глюкози у генетично хворих на діабет мишей [42]. Крім того, було показано, що GW1100, антагоніст GPR40, пригнічує опосередковану GPR40 секрецію інсуліну в лінії β -клітин MIN6 [43]. У людей природний варіант GPR40 (G180S) зменшує здатність β -клітин підшлункової залози сприймати ліпідів та погіршує секрецію інсуліну, індуковану FFAs [44]. GPR40-опосередкований вплив на стимульовану глюкозою секрецію інсуліну був пов'язаний із збільшенням кількості Ca^{2+} і не змінювалися інгібуванням позаклітинних сигнал-регульованих кіназ, що були також активовані, коли FFAs зв'язувалися з GPR40 [45]. Прийом їжі активує GPR40, що експресується на ентероендокринних клітинах кишкового тракту, опосередковуючи секрецію гормонів інкретину [46], які також стимулюють вивільнення інсуліну β -клітинами. Повні агоністи GPR40 підвищували рівень інкретину в мишачій моделі цукрового діабету 2 типу, нормалізуючи рівень глюкози в крові [47]. Миші $Gpr40^{-/-}$ мають знижену секрецію інкретину та інсуліну у відповідь на жир, і вони не захищені від резистентності до інсуліну, спричиненою дієтою з високим вмістом жиру [48].

Було показано, що багато FFAs та їх похідні, включаючи лауринову кислоту, міристинову кислоту, пальмітинову кислоту, олеїнову кислоту, лінолеву кислоту, ліноленову кислоту, арахідонову кислоту, ейкозапентаєнову кислоту та 9-гідроксіоктадекадієнову кислоту, є ендogenousними лігандами як GPR40, так і PPAR γ . Усі тіазолідиндіони, включаючи циглітазон, трогліта-

зон, розиглітазон і піоглітазон, зв'язуються з GPR40 і активують його з подальшою передачею сигналу, що включає шляхи стрес-кінази [49].

1.3.2 Роль G-білок-зв'язаних рецепторів та жирних кислот в посиленні секрецію інсуліну

Високопродуктивні скринінгові аналізи дозволили ідентифікувати ендогенні ліганди для G-білкових рецепторів (GPCR) [50]. Ці методології скринінгу дозволили подальшу ідентифікацію GPCR, які реагують на жирні кислоти, причому окремі GPCR демонструють відносну селективність до довжини ланцюга жирної кислоти та ступеня насичення [51]. GPR40 сильно експресується в β -клітинах і виявився ключовим білком, що опосередковує потенціювання інсуліну вільними жирними кислотами, і привабливою мішенню для посилення секреції інсуліну у пацієнтів з діабетом 2 типу. GPR40 є членом підродини гомологічних GPCR без інтронів, розташованих на хромосомі 19q13.1, до яких належать GPR41, GPR42 і GPR43 [52]. Подальші дослідження двох груп ідентифікували вільні жирні кислоти як ліганди для білка GPR40 [53, 54], і GPR40 демонструє вищу спорідненість до довголанцюгових жирних кислот із напівмаксимальною ефективною концентрацією (EC_{50}) у 1–2 мкмоль/л. діапазон [55].

Схоже, що GPR40 відіграє важливу роль у опосередкованому жирними кислотами посиленні секреції інсуліну. siRNA або опосередковане олігонуклеотидом зниження GPR40 у β -клітинних лініях або ізольованих мишачих острівцях зменшувало посилення жирними кислотами секреції інсуліну [56, 57]. Подібним чином, порушення GPR40 у мишей (GPR40^{-/-}) зменшує індукцію секреції інсуліну жирними кислотами [58] *in vivo*. Навпаки, трансгенна надекспресія GPR40 призводить до покращення стимульованої глюкозою секреції інсуліну у мишей як у дикого типу, так і у мишей з діабетом [59]. Острівці, виділені від цих тварин, продемонстрували стійку реакцію на пальмітинову кислоту *in vitro* порівняно з контролем. Результати цих досліджень

показують, що ~50% посилення секреції інсуліну жирними кислотами опосередковується GPR40.

Схоже, що зв'язування жирної кислоти з GPR40 активує комплекс $G_{\alpha q/11}$ -протеїн, що призводить до активації фосфоліпази C (PLC) [53]. PLC гідролізує мембранні ліпіди, що містять фосфоінозитол, утворюючи інозитол 1,4,5-трифосфат (IP3) і діацилгліцерин. IP3, у свою чергу, здається, опосередковує підвищення внутрішньоклітинних рівнів Ca^{2+} , яке відбувається після активації GPR40. Дослідження групи Poitout [60] показують, що утворення діацилгліцерину може бути ключовою подією після активації GPR40. Вони показали, що острівці, отримані від мишей з генетичним порушенням GPR40 ($GPR40^{-/-}$), нормально реагували на глюкозу, але не показали збільшення секреції інсуліну після впливу олеїнової кислоти. Однак лікування проникним для клітин діацилгліцерином значно збільшило секрецію інсуліну другої фази як в острівцях дикого типу, так і в $GPR40^{-/-}$. Жирні кислоти індукують фосфорилування та активацію фосфоліпази D1 (PKD1), яка, імовірно, модулює реорганізацію мережі коркового актину, яка лежить в основі другої фази секреції інсуліну [8]. «Нокдаун» білка PKD1 пригнічує посилення жирними кислотами секреції інсуліну. Залишається невизначеним, як активація опосередкованої GPR40 активації $G_{\alpha q/11}$ призводить до підвищення активності PLC і чи є активація PKD єдиним способом підвищення рівня діацилгліцеролу (DAG) у відповідь на стимуляцію глюкозою в β -клітинах.

1.3.3 Чи існує потенціал несприятливих наслідків тривалої стимуляції GPR40?

Численні дослідження *in vivo* та *in vitro* показали, що тривалий вплив жирних кислот, з або без підвищеного рівня глюкози, призводить до секреторних дефектів β -клітин і прямих токсичних ефектів, які призводять до загибелі β -клітин. Дослідження на людях свідчать про наявність генетичної схильності до впливу жирних кислот, оскільки родичі першого ступеня пацієнтів

з діабетом 2 типу без ознак захворювання були значно більш сприйнятливими до порушення секреції інсуліну через підвищення рівня жирних кислот у плазмі [61]. Враховуючи вплив тривалого впливу жирних кислот, різні дослідження на тваринах із порушенням GPR40 викликали суперечки щодо потенційної ролі GPR40 у посередництві «токсичних» ефектів жирних кислот. У початковому дослідженні Steneberg et al. [62] показали, що порушення GPR40 в β -клітинах знижує здатність жирних кислот потенціювати секрецію інсуліну, як це передбачає біологія рецепторів *in vitro*. Але порушення GPR40 захистило мишей від несприятливих наслідків тривалого впливу жирних кислот і згубного впливу дієти з високим вмістом жирів на секрецію інсуліну. Це попереднє дослідження показало, що антагоніст GPR40 може бути життєздатною мішенню для лікування діабету. Подальші дослідження, проведені двома групами, не змогли відтворити ці результати [63, 64] з аналогічним порушенням функції острівців після впливу *in vitro* та *in vivo* жирних кислот. Група вчених [65] використовували мишей із порушенням GPR40 у всьому тілі та досліджували гомеостаз глюкози та секрецію інсуліну *in vivo* та динаміку секреції інсуліну *in vitro* після короточасного та тривалого впливу жирних кислот. Миші GPR40^{-/-} були фенотипово подібними до тварин дикого типу та не показали змін у рівнях глюкози чи інсуліну на початковому рівні або у відповідь на тест на толерантність до глюкози. Інфузія жирних кислот у формі інтраліпиду посилювала секрецію інсуліну у мишей дикого типу, але цей ефект був знижений на 50% у мишей GPR40^{-/-}. Острівці, виділені від мишей дикого типу та GPR40^{-/-}, показали ідентичну секрецію інсуліну у відповідь на різке підвищення рівня глюкози в середовищі та деполяризацію KCl. Однак посилення вивільнення інсуліну жирними кислотами було знижено в острівцях, отриманих з GPR40^{-/-}, але показало подібне зниження секреції інсуліну після інкубації з пальмітиновою кислотою протягом 72 годин. Причина цих суперечливих результатів не ясна, хоча потенційні причини були описані раніше [66].

1.3.4 Фармакологія *in vivo* агоністів GPR40 на моделях гризунів

Розробка синтетичних агоністів GPR40 зі сприятливим впливом на секрецію інсуліну *in vitro* та *in vivo* продемонструвала, що активація рецептора є життєздатним варіантом лікування діабету. Було розроблено велику кількість синтетичних агоністів рецептора GPR40, деякі з яких, імовірно, повторюють дію жирних кислот на посилення секреції інсуліну [8]. На підставі первинного спостереження Котарського [67], що деякі тiazолідиндіони можуть активувати поверхневі рецептори, пізніше визначені як GPR40, Tan et al. [68] перевірили бібліотеку тiazолідиндіонів і оптимізували провідного кандидата (Cpd-B). Ці молекули підвищували секрецію інсуліну в острівцях, виділених від мишей дикого типу, але були неактивними в острівцях від мишей GPR40^{-/-}. Важливо, що вплив острівців дикого типу та GPR40^{-/-} показало зниження секреції інсуліну після 3 днів впливу вільних жирних кислот, тоді як вплив Cpd-B не мав жодного впливу на секрецію інсуліну. Подібним чином перорально активне похідне (2,3-дигідро-1-бензофуран-3-іл) оцтової кислоти показало залежне від дози зниження рівня глюкози у щурів Goto-Kakizaki (GK), моделі діабету 2 типу з порушенням рівня глюкози, залежна від інсуліну секреція. Подібні результати були знайдені з іншими агоністами [69]. Tsujihata та ін. [70] досліджували ефект TAK-875, перорального біоактивного агоніста GPR40 з EC₅₀ для активації рецептора 72 нмоль/л. Як і у випадку з Cpd-B, тривалий вплив TAK-875 на острівці щурів не впливав на опосередковану глюкозою секрецію інсуліну. Щури, які відчували непереносимість глюкози шляхом багаторазового введення низьких доз стрептозотозину, показали дозозалежне покращення толерантності до глюкози. Подібним чином TAK-875 підвищував рівень інсуліну та знижував концентрацію глюкози в плазмі у жирних щурів з діабетом Zucker, моделі інсулінорезистентного діабету 2 типу. У сукупності ці дослідження надають додаткові докази того, що хронічна активація GPR40 не опосередковує токсичність жирних кислот у β-клітинах[8].

1.3.5 Дослідження на людях з агоністом GPR40 TAK-875

TAK-875 був першим агоністом GPR40, який було перевірено на ефективність у людей. Початкові дослідження показали, що сполука швидко всмоктується з періодом напіврозпаду 28–30 годин і очищається переважно шляхом глюкуронідації в печінці з мінімальним кліренсом із сечею [71]. Рандомізоване 14-денне дослідження фази I експозиції у двох пацієнтів з діабетом показало залежне від дози зниження рівня глюкози натщесерце та після провокаційного введення глюкози та підвищення рівня C-пептиду в сироватці після перорального тесту на толерантність до глюкози [72].

На підставі цих сприятливих результатів було проведено 12-тижневе подвійне сліпе плацебо-контрольоване дослідження фази II за участю пацієнтів з діабетом 2 типу, у якому порівнювали щоденне введення TAK-875 і глімепіриду з плацебо [73]. Суб'єкти з HbA_{1c} між 7,5 і 10,9%, які або раніше не приймали ліки (24), або отримували терапію лише метформіном (76%), були рандомізовані для плацебо (n = 61), TAK-875 (6,25, 25, 50, 100, або 200 мг) (n = 303), або глімепірид (4 мг) (n = 62). Наприкінці лікування рівень HbA_{1c} значно впав порівняно з вихідним у групі TAK-875 між $-0,65 \pm 0,114$ і $-1,12\% \pm 0,113\%$, що було подібно до рівня глімепіриду, який знизився на $-1,05 \pm 111\%$. Обидві групи активного лікування показали більшу ефективність, ніж плацебо ($-0,13 \pm 115\%$). Були послідовні, значні зміни, спричинені TAK-875 у дозах >50 мг/добу, у рівні глюкози в крові натщесерце, і вони були подібні до змін, що спостерігалися у пацієнтів, які отримували глімепірид. Початок дії був швидким, зміни рівня глюкози в крові натще відбулися в перші 2 тижні лікування. Важливо відзначити, що з часом не спостерігається зниження ефективності, що свідчить про те, що агоніст GPR40 не викликає дисфункції β -клітин при тривалому лікуванні, що є аргументом проти потенційного несприятливого ефекту сполук при тривалому впливі [8].

Дані вимірювань рівня інсуліну натще та стимульованого глюкозою рівня інсуліну свідчать про те, що механізм дії TAK-875 зумовлений посилен-

ням секреції інсуліну. Чутливість до інсуліну, оцінена за індексом Мацуди [74], не змінилася порівняно з вихідним рівнем у жодній групі лікування. Більш високі дози ТАК-875 (25, 100 і 200 мг/день) збільшували секрецію інсуліну β -клітинами, що оцінювалося значним збільшенням співвідношення С-пептид/глюкоза через 30 хвилин під час орального тесту на толерантність до глюкози. Незважаючи на те, що глімепірид є прискорювачем секреції інсуліну, у пацієнтів, які отримували глімепірид, ефекту не спостерігалось порівняно з пацієнтами, які приймали плацебо. Це було пов'язано з тим фактом, що тест проводився через 24 години після останньої дози препарату, де значно довший період напіврозпаду ТАК-875 порівняно з глімепіридом може спричинити залишкові ефекти [71].

Профіль побічних ефектів був подібним між групами лікування, за винятком значно вищого рівня гіпоглікемії та значного збільшення ваги в групі глімепіриду порівняно з плацебо. У групі ТАК-875 не спостерігалось суттєвої зміни ваги порівняно з вихідним рівнем, але спостерігалось невелике, значне збільшення ваги порівняно з групою плацебо, яка продемонструвала невелику втрату ваги протягом 12-тижневого періоду лікування. Не було значного впливу ТАК-875 на артеріальний тиск або параметри ліпідів протягом періоду лікування. Позитивні результати будуть додатково досліджені в поточних клінічних дослідженнях III фази, щоб повністю зрозуміти безпеку та ефективність агоністів GPR40 у лікуванні діабету 2 типу [8].

Проте, не дивлячись на те, що ТАК-875 здавався перспективним проти-діабетичним препаратом, його розробка була припинена в 2013 році через ризик можливого ураження печінки. Хоча причина ураження печінки залишається незрозумілою, GPR40 не експресується в печінці людини, що свідчить про те, що токсичність може бути викликана не самим рецептором GPR40, а хімічними характеристиками ТАК-875 або його дозою, яка використовувалась в клінічних випробуваннях [1].

1.4 Огляд N-ацилетаноламінів як потенційних антидіабетичних лікарських засобів та їх механізмів дії

Ендоканабіноїди – це великий клас біологічно активних ліпідних медіаторів, який складається з амідів, ефірів та етерифікованих похідних довголанцюжкових насичених та ненасичених жирних кислот, які можуть синтезуватись практично в усіх органах та тканинах теплокровних [75].

До ендоканабіноїдів належить клас мінорних ліпідів – N-ацилетаноламіни (NAEs). NAEs є класом біологічно-активних ендогенних сполук, які складаються з амідної групи (етаноламіну) та жирної кислоти, що зв'язані між собою (рис. 1.1).

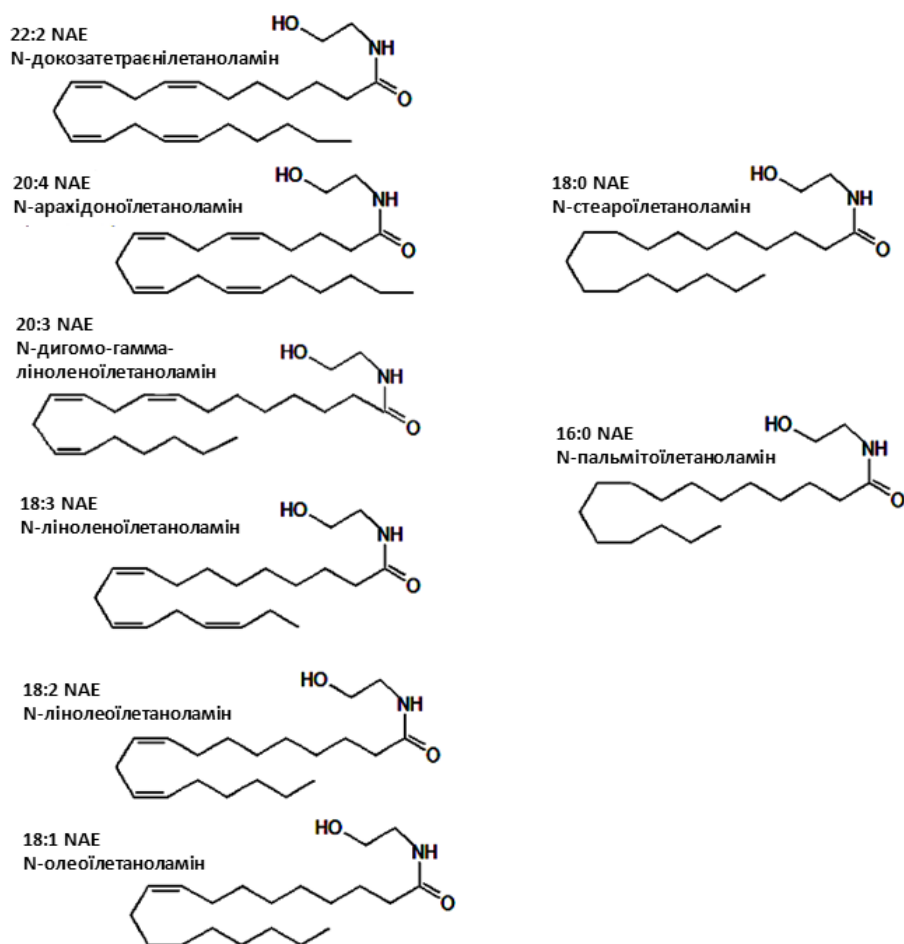


Рис.1.1. Деякі представники N-ацилетаноламінів

Їх хімічна структура включає N-ацильну групу, яка походить від жирної кислоти, та етаноламінову групу, яка містить амінну та гідроксильну групи. Жирні кислоти, які можуть бути пов'язані з етаноламіном, можуть бути різних довжин та структури, включаючи стеаринову кислоту, арахідонову кислоту, пальмітинову кислоту та інші [76].

N-ацилетаноламіни є природними речовинами, які зустрічаються у різних організмах, включаючи людей, тварин та рослини. Вони можуть бути синтезовані в організмі шляхом ферментативної ацетилювання аміну звільненої жирної кислоти та етаноламіну. Також N-ацилетаноламіни можуть бути отримані з дієтарних джерел, таких як риба, м'ясо, олія, або використовуватися в якості дієтичних доповнень [77].

N-арахідоноїлетаноламід (анандамід; AEA) та 2-арахідоноїлгліцерол (2-AG) є найбільш відомими та добре вивченими з класу N-ацилетаноламінів (NAEs). Вони взаємодіють зі специфічними рецепторами CB1 та CB2, у той час як N-стеароїлетаноламін (NSE), який також є насиченим NAE і має канабіміметичні властивості, не активує рецептори CB, але може взаємодіяти з рецепторами TRPV1 та PPAR, які активуються при проліферації пероксисом [78].

Ендоканабіноїди відіграють важливу роль у багатьох фізіологічних функціях і проявляють широкий спектр біологічної активності, включаючи протизапальну, антиоксидантну, мембраностабілізуючу, імуномодулюючу, нейропротекторну та адаптогенну дію. Порушення регуляції ендоканабіноїдної системи пов'язують з численними захворюваннями, і тому фармакологічна модуляція цієї системи є перспективною стратегією для лікування запальних, нейродегенеративних, серцево-судинних, метаболічних захворювань, ішемії/реперфузії та раку.

Ендоканабіноїди також відіграють роль у енергетичному метаболізмі периферичних тканин, а метаболізм жирової тканини та гормональна секреція є прямо залежними від активації та інгібування ендоканабіноїдної системи. Активація CB1 рецепторів у адипоцитах сприяє накопиченню ліпідів у

жирових краплях, зниженню рівня адипонектина, активності PPAR γ та збільшенню активності ліпопротеїнліпази. Тому канабіноїдна система відіграє роль у патогенезі цукрового діабету 2-го типу, і регуляція активності цієї системи може бути цікавим підходом для терапії цього захворювання, яке має поліфакторний характер [79].

1.4.1 Роль N-ацилетаноламінів у регуляції рівня глюкози в крові та вплив на інсулінорезистентність

N-ацилетаноламіни, зокрема N-арахідоноїлетаноламін (ANA) та N-олеоїлетаноламін (NOE), відіграють важливу роль у регуляції рівня глюкози в крові. Вони впливають на різні аспекти обміну глюкози, що сприяє забезпеченню глікемічної контролю.

ANA і NOE виробляються в організмі з відповідних ненасичених жирних кислот та етаноламіну за участю ферментів. Ці сполуки взаємодіють з різними рецепторами та факторами регуляції, що мають вплив на обмін глюкози [80].

Один з механізмів, за якими N-ацилетаноламіни впливають на регуляцію рівня глюкози, пов'язаний з активацією пероксисомального активованого рецептора α (PPAR- α). ANA активує PPAR- α , що сприяє зниженню рівня глюкози в крові шляхом збільшення окиснення жирних кислот і зменшення глюконеогенезу (синтезу глюкози) у печінці.

NOE, з свого боку, впливає на рівень глюкози в крові шляхом стимуляції глюкозового транспорту. Він активує білок-транспортер глюкози типу 4 (GLUT4) в скелетних м'язах та адипоцитах, що сприяє збільшенню поглинання глюкози цими тканинами.

Крім того, N-ацилетаноламіни можуть впливати на інші процеси, пов'язані з обміном глюкози, такі як гліколіз (розщеплення глюкози) та окиснення глюкози. Дослідження показують, що ці сполуки можуть модулювати актив-

ність ферментів, що відповідають за ці процеси, і таким чином впливати на рівень глюкози в організмі [81].

Інсулінорезистентність є ключовим фактором у розвитку діабету 2 типу. N-ацилетаноламіни, зокрема N-арахідоноїлетаноламін (ANA) і N-олеоїлетаноламін (NOE), проявляють потенційну здатність впливати на інсулінорезистентність та поліпшувати чутливість тканин до інсуліну.

ANA та NOE взаємодіють з різними рецепторами та факторами сигналізації, які є важливими у регуляції інсулінорезистентності. Один з ключових рецепторів, з яким вони взаємодіють, є пероксисомальний активований рецептор α (PPAR- α). Активація PPAR- α сприяє зменшенню інсулінорезистентності шляхом поліпшення метаболізму жирних кислот та зменшення запального відгуку [82].

ANA також впливає на інсулінорезистентність шляхом модуляції активності інсулін-сигнальних шляхів. Він може впливати на фосфорилування та активацію інсулінового рецептора, а також на активність інсулін-залежних кіназ. Це сприяє поліпшенню інсулінорезистентності та підвищенню чутливості тканин до інсуліну.

NOE, з свого боку, впливає на інсулінорезистентність шляхом зміни активності різних факторів, пов'язаних з обміном глюкози. Він може модулювати активність білків-транспортерів глюкози, таких як GLUT4, і поліпшувати поглинання глюкози в тканинах [83].

Дослідження на тваринах та клітинах підтверджують потенційну роль N-ацилетаноламінів у зменшенні інсулінорезистентності та поліпшенні чутливості до інсуліну. Вони можуть бути перспективними кандидатами для розробки нових антидіабетичних лікарських засобів.

N-ацилетаноламіни можуть впливати на глюкозовий транспорт та метаболізм, що впливає на рівень глюкози в крові. Наприклад, NOE виявляє здатність стимулювати глюкозовий транспорт шляхом активації білка-транспортера глюкози типу 4 (GLUT4) в скелетних м'язах та адіпоцитах. Крім того, деякі N-ацилетаноламіни можуть впливати на глюкозовий метабо-

лізм, включаючи інгібування глюконеогенезу (синтезу глюкози) та сприяння гліколізу (розщеплення глюкози) [84].

При вивченні впливу NSE на стан антиоксидантної системи та ліпідний склад печінки щурів за інсулінорезистентного стану було виявлено, що NSE відновлює про-/антиоксидантний баланс печінки щурів шляхом корекції ліпідного дисбалансу тканини печінки, спричиненого жировим навантаженням. В проведених дослідженнях, було виявлено, що введення NSE за інсулінорезистентного стану сприяє загальному відновленню рівня основних фосфоліпідів печінки щурів, що корелює зі зниженням рівня інсуліну у плазмі крові та покращенням чутливості до нього [85, 86]. Застосування NSE щурам з інсулінорезистентним станом, спричиненим розвитком аліментарного ожиріння, сприяє відновленню розподілу жирних кислот між ліпідними фракціями печінки щурів, що може бути пов'язано з його модулювальною дією на активність основних десатураз та є важливим для підтримання функціонального стану інсулінозалежної тканини печінки щурів за цієї патології [87, 88]. За дії NSE відбувається нормалізація процесів пероксидного окиснення ліпідів та протеїнів в печінці щурів з індукованим інсулінорезистентним станом, що може мати протекторний вплив на інсулінозалежну тканину печінки за умов жирового навантаження. Застосування NSE щурам з експериментальним інсулінорезистентним станом сприяє відновленню активності основних ензимів антиоксидантного захисту, пригнічення активності яких було спричинено зростанням вмісту продуктів пероксидації ліпідів та протеїнів за умов дієти з високим вмістом насичених жирів [89].

РОЗДІЛ 2

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Конструювання лігандів

Просторові структури N-олеоїлетаноламіну (NOE), N-ліноїлетаноламіну (NLE) було сконструйовано за допомогою онлайн 3D редактора просторових структур CORINA Classic. Цей редактор дозволяє на підставі відомої структурної чи молекулярної формули певної речовини створити комп'ютерну модель, що описує просторові координати атомів, з яких складається ця молекула, а також типи зв'язків між ними (поодинокі, подвійні тощо).

Створені просторові моделі зберігали у форматі PDB, завантажували у програму AutoDockTools 1.5.6, додавали атоми водню та зберігали у файлах формату PDBQT.

2.2 Молекулярний докінг

Молекулярне моделювання взаємодії NSE, NPE, NLE, NOE, ANA, 2-AG та SA з просторовою структурою протеїну GPR40 здійснювали методом молекулярного докінгу. В дослідженні використовували 2 моделі просторових структур протеїну GPR40, отримані з інтернет-ресурсу RCSB Protein DataBank (коди 5TZR та 5TZY).

Просторові структури досліджуваних NAEs було отримано з інтернет-ресурсів DrugBank, PubChem чи сконструйовано самостійно.

Просторові структури підготовляли до докінгу у програмі AutoDockTools 1.5.6. (видаляли референтний ліганд, додавали всі атоми водню, видаляли молекули води, візуально задавали параметри сітки потенціалів (grid box) таким чином, щоб у ній знаходився ліганд-зв'язуючий центр протеїну GPR40, який ідентифікували за допомогою референтного ліганду МК-8666.

Параметри сітки потенціалів grid box для моделі рецептора GPR40 5TZR були: center_x = -41.605; center_y = 3.974; center_z = 64.171; size_x = 47.25; size_y = 47.25; size_z = 47.25.

Параметри сітки потенціалів grid box для моделі рецептора GPR40 5TZY були: center_x = -23.0; center_y = 0.889; center_z = 60.889; size_x = 47.25; size_y = 47.25; size_z = 47.25.

За допомогою цієї ж програми визначали амінокислотні залишки, що беруть участь у зв'язуванні досліджуваних лігандів з активним центром протеїну GPR40. Найменшу вільну енергію зв'язування ліганду з макромолекулою (НВЕЗ) визначали за допомогою програми AutoDock Vina 1.1.2. Використовували комп'ютер з операційною системою Windows 10 x64 PRO 1909 з 16 Гб RAM DDR4, 6 Гб відео RAM, дванадцять ядер процесору AMD Ryzen 5 2600 3.40GHz.

2.3 Визначення константи інгібування ліганду

Розрахунок константи інгібування (K_i) досліджуваних N-ацилетаноламінів для протеїну GPR40 проводили за формулою 1:

$$K_i = \exp\left(\frac{\Delta G}{RT}\right), \quad (1)$$

де ΔG — найменша вільна енергія зв'язування з макромолекулою;

R — газова стала ($= 1.98720425864083 \dots \times 10^{-3}$ ккал·К⁻¹·моль⁻¹);

T — кімнатна температура (298,15°K).

2.4 Визначення амінокислотних залишків, що беруть участь у взаємодії ліганда з рецептором

Визначення АК-залишків протеїну, з якими у активному центрі протеїну зв'язується ліганд, виконували за допомогою функції 'Show Interactions' пакету AutoDock Tools (рис. 2.1).

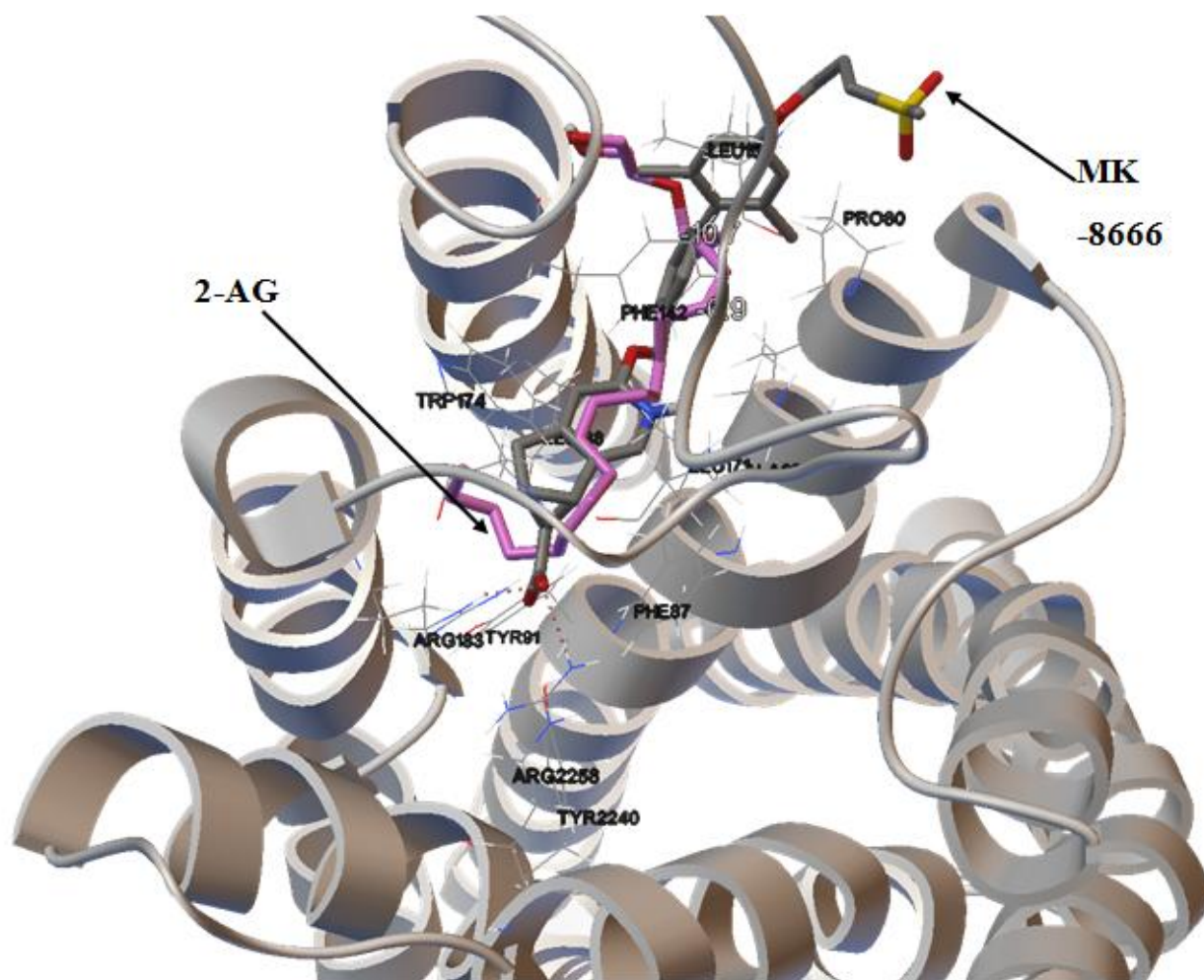


Рис. 2.1. Приклад візуалізації результату докінгу 2-Арахідоноїлгліцеролу (2-AG) з моделлю 5TZR рецептора GPR40 у програмі AutoDock Tools. МК-8666 – це референтний ліганд, присутній у просторовій структурі 5TZR, що ми використовували для визначення активного центру рецептора.

2.5 Визначення водневих зв'язків, що беруть участь у взаємодії ліганда з рецептором

Визначення водневих зв'язків ліганд–протеїн взаємодії виконували за допомогою функції ‘Show Interaction/Hydrogen bonds’ пакету AutoDock Tools (рис. 2.2).

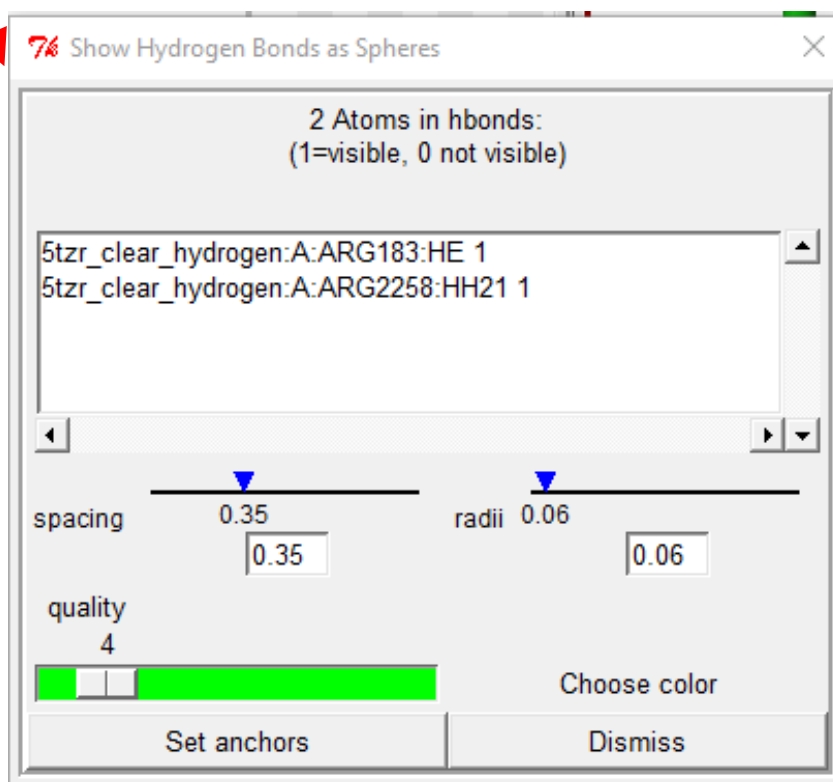
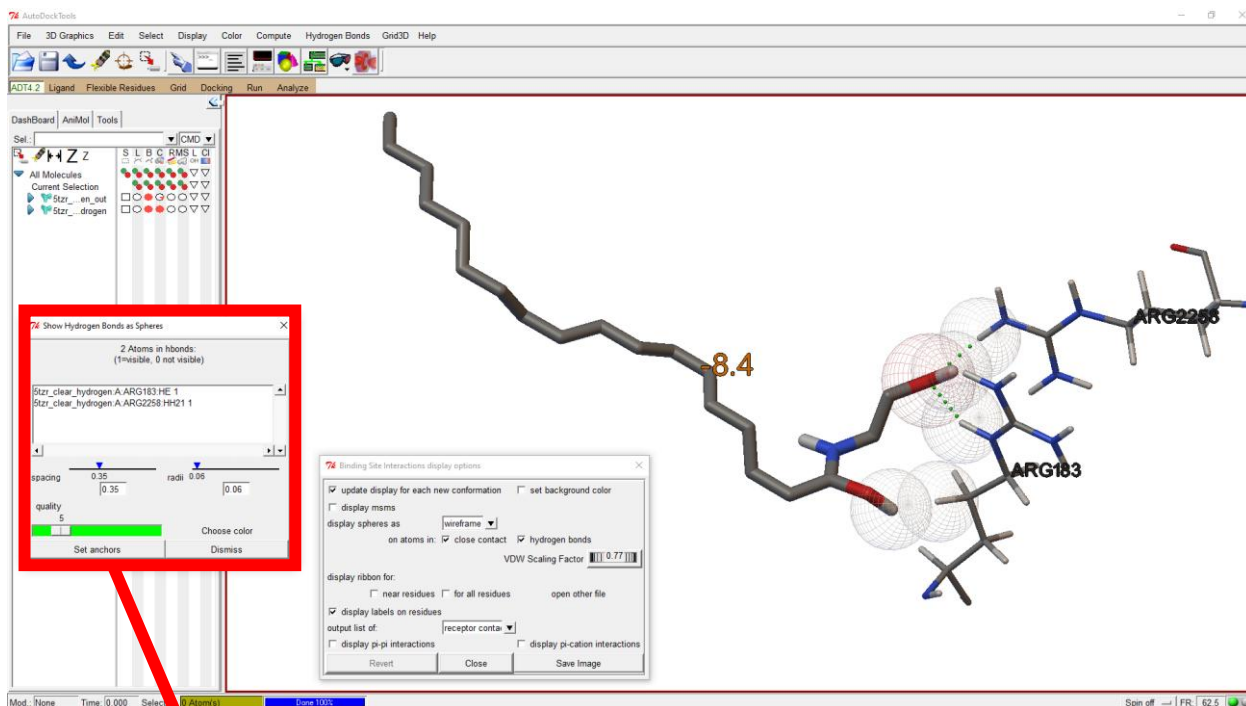


Рис. 2.2. Візуалізація роботи з програмою AutoDock Tools по пошуку та візуалізації водневих зв'язків при докінгу NSE в активний центр GPR40. На рисунку представлений знімок екрану під час роботи з програмою, а у виділеному діалоговому вікні ми можемо побачити описанні назви АК-залишків, з якими утворилися водневі зв'язки під час ліганд-протеїн взаємодії.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Для визначення активного центра рецептора GPR40, подальшого проведення докінгу досліджуваних NAEs в цей активний центр та для аналізу отриманих результатів, було взято за стандарт – референтний ліганд МК-8666. З лігандом МК-8666 було проведено вченими ряд досліджень, що підтверджують його міцне зв'язування з рецептором GPR40 та проявлення антидіабетичних властивостей, що робить цей ліганд цікавим для нас в якості контролю для нашого дослідження. Компанія Merck припинила програму розробки антидіабетичного лікарського засобу на основі МК-8666 у серпні 2014 року в очікуванні несприятливого співвідношення користі/ризика для цієї сполуки в цільовій групі хворих на діабет 2 типу. Для МК-8666 було виявлено негативний вплив на печінку пацієнтів, так само як і для іншого агоніста GPR40 – ТАК-875 (розробка компанії Takeda) [90].

3.1 Аналіз ефективності зв'язування досліджуваних NAEs з рецептором GPR40

Ефективність зв'язування досліджуваних NAEs з рецептором GPR40 оцінювали по найменшій енергії зв'язування. Результат докінгу досліджуваних NAEs з найменшою енергією зв'язування в активний центр протеїну GPR40 показані в табл. 3.1 та табл. 3.2.

В процесі докінгу програма AutoDock Vina генерувала більше мільярду варіантів конформацій досліджуваних NAEs і виводила в результат перші 9 конформацій з найменшими енергіями зв'язування.

При аналізі отриманих результатів, найменша енергія зв'язування з досліджуваних NAEs була виявлена у NSE, що було найближчими значеннями до значень, які показав референтний ліганд МК-8666 (табл. 3.1 та табл.3.2).

Тобто це свідчить про те, що NSE добре проявляє афінність до рецептора GPR40.

Таблиця 3.1

Результати докінгу різних NAEs з протеїном GPR40.

Модель рецептора GPR40: 5TZR

Ліганд	Енергія зв'язування, ккал/моль	Константа інгібування, Мкмоль	Амінокислоти активного центру, з якими зв'язується ліганд
МК-8666	-10.7	0.014	ALA83, ARG183, ARG2258, LEU138, LEU158, LEU171, PHE87, PHE142, PRO80, TRP174, TYR91, TYR2240, VAL84
NSE	-8.4	0.696	ALA83, ALA179, ARG183, ARG2258, LEU138, PHE142, PRO80, TRP174, VAL81, VAL84, VAL141
NOE	-7.3	4.457	ALA83, ALA179, ALA182, ARG183, LEU138, LEU171, PHE87, PHE142, TRP174, VAL84, VAL141
2-AG	-6.9	8.755	ALA83, ALA179, ALA182, AGR183, GLY139, LEU135, LEU138, LEU171, PHE87,

			PHE142, TRP174, VAL84
ANA	-6.7	12.271	ALA83, ALA182, ARG183, ARG2258, GLY139, LEU54, LEU135, LEU138, LEU171, PHE87, PHE142, TRP174, VAL84, VAL141
SA	-6.7	12.271	ALA83, ALA182, ARG183, LEU138, LEU171, PHE87, PHE142, TRP174, VAL84, VAL141
NPE	-6.6	14.528	ALA83, ARG183, ARG2258, GLY139, GLU172, LEU138, LEU171, PHE87, PHE142, TRP174, VAL84, VAL141
NLE	-5.8	56.049	ALA83, ALA182, ARG183, LEU135, LEU138, LEU171, PHE87, PHE142, TRP174, TYR91, VAL84, VAL141

Примітка: жирним виділено АК-залишки для NAEs, що співпадають з АК-залишками з якими зв'язується референтний ліганд МК-8666

Результати докінгу різних NAEs з протеїном GPR40.

Модель рецептора GPR40: 5TZY

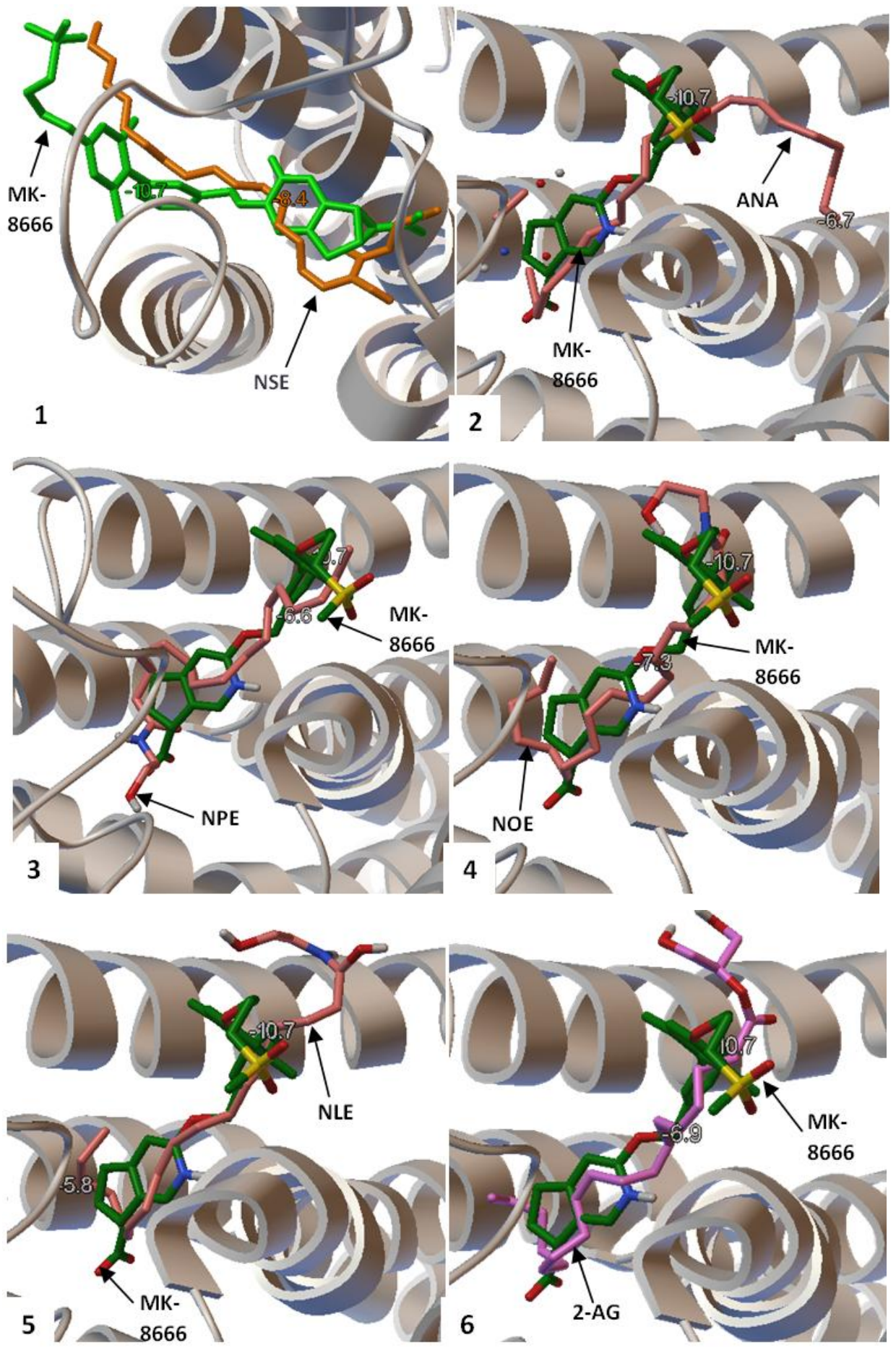
Ліганд	Енергія зв'язування, ккал/моль	Константа інгібування, Мкмоль	Амінокислоти активного центру, з якими зв'язується ліганд
МК-8666	-9.6	0.092	ALA83, LEU138, LEU171, PHE87, PHE142, PRO80, VAL84
NSE	-8	1.368	ALA146, ARG183, GLU145, LEU135, LEU138, LEU171, SER178, VAL84
NOE	-6.4	20.36	ALA83, ALA182, ARG183, GLY139, LEU135, LEU138, LEU171, PHE87, PHE142, VAL141
NPE	-6.3	24.103	ALA83, ALA146, ALA179, ARG183, GLU145, LEU135, LEU138, LEU186, LEU171, PHE87, PHE142, TRP174, VAL141
SA	-6.3	24.103	ALA83, ARG183, LEU138, LEU171, LEU186, PHE87, PHE142, PRO80, TYR91

NLE	-6.1	33.781	ALA83 , ALA179, ARG183, GLY139, LEU138 , LEU171 , PHE87 , PHE142 , PRO80 , VAL141
ANA	-5.6	78.555	ALA66, ARG183, ARG2258, ASP2, GLU172, GLY70, GLY180, LEU3, LYS62, LYS2259, SER8, SER69
2-AG	-5.3	130.339	ALA83 , GLY139, LEU54, LEU138 , PHE142 , PRO80 , TRP131, VAL84

Примітка: жирним виділено АК-залишки для NAEs, що співпадають з АК-залишками з якими зв'язується референтний ліганд МК-8666

В результаті нашого дослідження виявилось, що всі NAEs з різною афінністю здатні зв'язуватись з ліганд-зв'язуючим доменом GPR40.

Параметри молекулярного докінгу були нами вибрані такі, що стикування проводилося в максимальній області, яку дозволяє програма AutoDock Tools, щоб туди потрапив також і активний центр рецептора GPR40. При цьому кількість позицій (варіантів) стикування кожного з досліджуваних NAEs складала приблизно від 2×10^8 до 2×10^9 . З цієї достатньо великої кількості варіантів зв'язування досліджуваних NAEs з активним центром GPR40 найменшу енергію зв'язування (тобто найбільшу спорідненість, чи афінність) виявили такі конформації NAEs, місця зв'язування яких знаходилися саме в активному центрі протеїну GPR40 (рис. 3.1 та рис. 3.2).



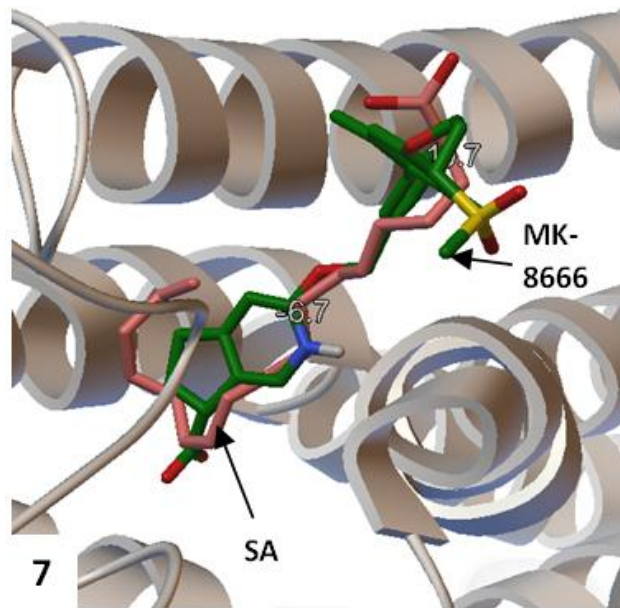
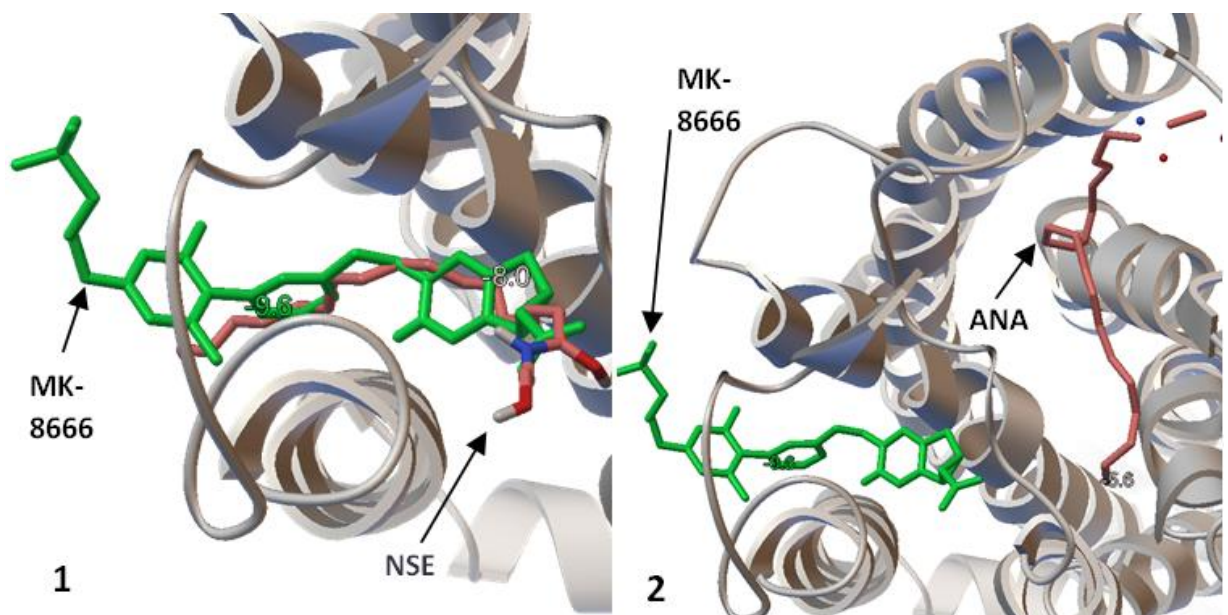


Рис. 3.1. Візуалізація результатів докінгу різних NAEs з моделлю 5TZR рецептора GPR40. Де МК-8666 – це референтний ліганд для визначення активного центру рецептора.

1 – N-стеароїлетаноламін (NSE); **2** – N-арахідоноїлетаноламін (анандамід) (ANA); **3** – N-пальмітоїлетаноламін (NPE); **4** – N-олеоїлетаноламін (NOE); **5** – N-ліноїлетаноламін (NLE); **6** – 2-Арахідоноїлгліцерин (2-AG); **7** – Стеаринова кислота (SA)



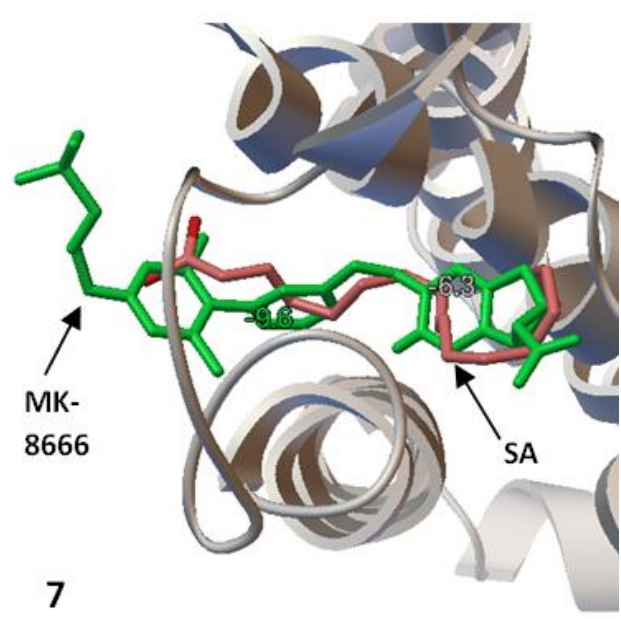
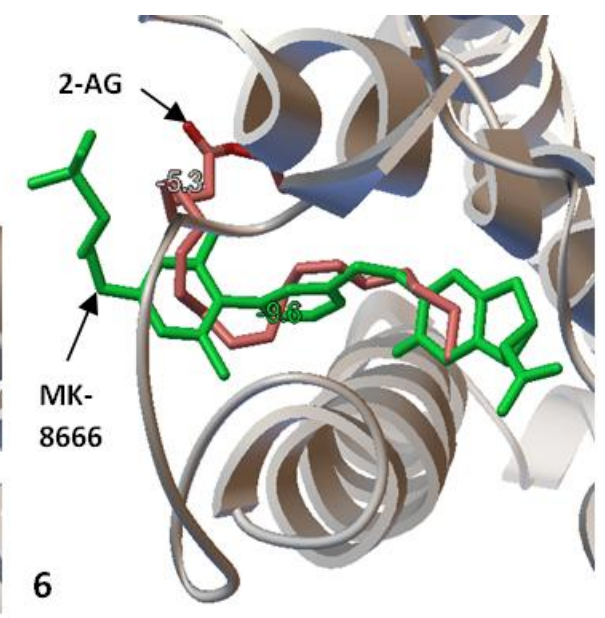
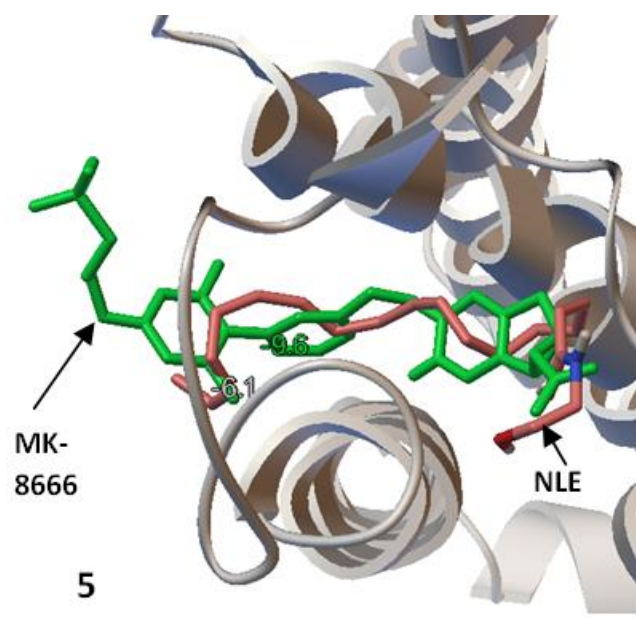
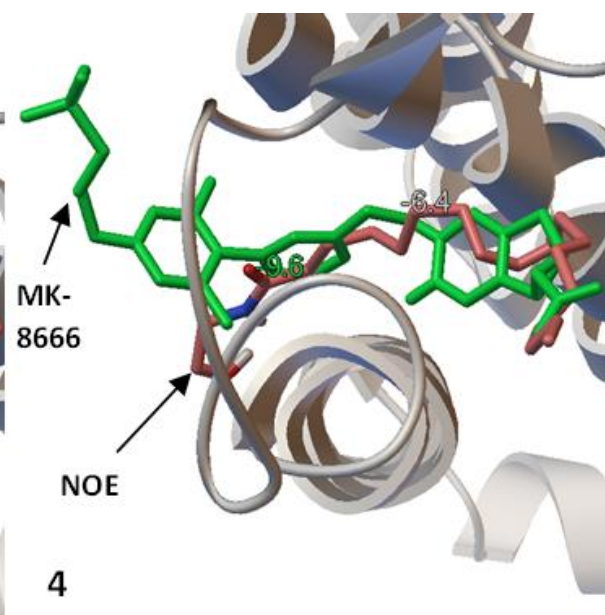
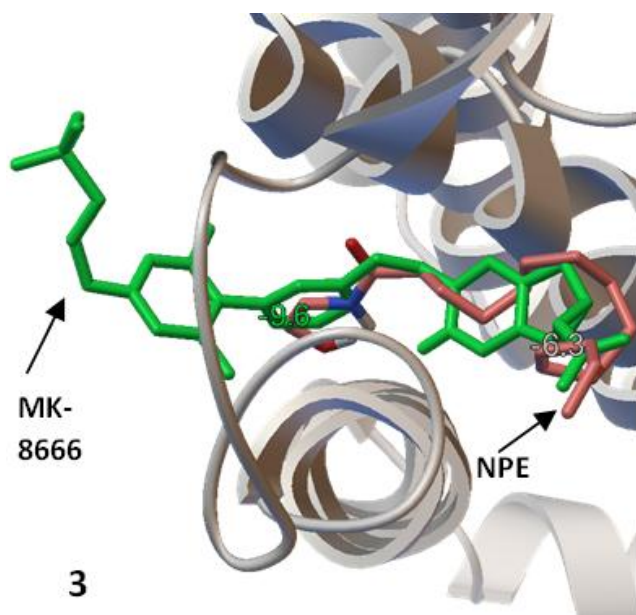


Рис. 3.2. Візуалізація результатів докінгу різних NAEs з моделлю 5TZY рецептора GPR40. Де МК-8666 – це референтний ліганд для визначення активного центру рецептора.

1 – N-стеароїлетаноламін (NSE); **2** – N-арахідоноїлетаноламін (анандамід) (ANA); **3** – N-пальмітоїлетаноламін (NPE); **4** – N-олеоїлетаноламін (NOE); **5** – N-ліноїлетаноламін (NLE); **6** – 2-Арахідоноїлгліцерин (2-AG); **7** – Стеаринова кислота (SA)

3.2 Аналіз отриманих значень константи інгібування досліджуваних NAEs

Відомо, що константа інгібування (K_i) є показником того, наскільки потужним є інгібітор [91]. Це концентрація речовини, необхідна для досягнення 50-відсоткового гальмування активності протеїну. K_i відображає спорідненість до зв'язування інгібітора з протеїном-мішенню. Чим менша K_i , тим менша кількість ліків необхідна для того, щоб пригнічувати активність певного протеїну. Використання K_i корисне для визначення вірогідності того, що конкретна лікарська речовина інгібуватиме конкретний протеїн і призведе до клінічно значущої її взаємодії з протеїном-мішенню (рецептором).

В наших дослідженнях K_i для досліджених NAEs при зв'язуванні з моделлю 5TZR рецептора GPR40 мала значення від 0,696 до 56,049 мкмоль, а для моделі 5TZY рецептора GPR40 значення були від 1,368 до 130,339 мкмоль. NSE з представлених NAEs має найменшу величину константи інгібування та найбільш близьку по значенню до МК-8666 (див. табл. 3.1 та табл.3.2).

З літератури відомо, що якщо K_i лікарської речовини набагато більша (у 10 разів і більше), ніж її концентрація в плазмі крові пацієнта, то така речовина навряд чи буде інгібувати активність певного протеїну в організмі. В попередніх дослідженнях, проведених у відділі біохімії ліпідів Інституту біо-

хімії ім. О.В.Палладіна НАН України *in vivo*, було встановлено, що біологічну дію N-стеароїлетаноламін проявляє при дозі 50 мг/кг маси тіла [92]. При цьому концентрація цього NAE в крові мишей, виміряно мас-спектрометрично, дорівнює 60-100 мкмоль/л. [93].

Таким чином, виходячи із отриманих нами значень константи інгібування (K_i), розрахованої на підставі вільної енергії зв'язування, цілком імовірно, що більшість досліджуваних NAEs можуть бути кандидатами до використання в якості лікарських засобів з антидіабетичною дією, оскільки більшість значень істотно не перевищують вміст екзогенних NAEs в організмі (60-100 мкмоль) за умов використання дози 50мг/кг маси тіла. Константа інгібування 2-AG для моделі 5TZY рецептора GPR40 вийшла досить високою в порівнянні до інших отриманих значень, та становила 130.339 мкмоль. Отримане значення частково перевищує діапазон 60-100 мкмоль. Це не означає, що 2-AG не буде проявляти жодної ефективності в якості антидіабетичного лікарського засобу, але це свідчить про те, що для досягнення терапевтичного ефекту для 2-AG знадобиться його дуже висока, не фізіологічна концентрація. Це унеможливило використання його в якості лікарського засобу.

3.3 Амінокислотні залишки GPR40, що беруть участь у зв'язуванні NAEs

В результаті проведених досліджень виявилось, що в більшості випадків NAEs зв'язуються з тими ж АК-залишками в ліганд-зв'язуючому домені, що й референтна речовина МК-8666 (див. табл. 3.1 та табл.3.2). Ці дані свідчать про те, що більшість NAEs, стикуються саме в активний центр GPR40 (туди ж, де зв'язується референтна речовина МК-8666) (рис. 3.1 та рис. 3.2). Проте, було виявлено, що ANA у випадку з моделлю 5TZY оминає активний центр (рис. 3.2 (2)), та не має жодних спільних АК-залишків з МК-8666, в той самий час як ANA у випадку з моделлю 5TZR рецептора GPR40 потрапив у активний центр (рис. 3.2 (2)), (див. також табл. 3.1).

N-стеароїлетаноламін мав спільні АК-залишки з референтним лігандом МК-8666 для обох досліджуваних моделей рецептора GPR40 (табл. 3.1 та табл.3.2), а також при візуалізації даних ми можемо чітко побачити, що положення NSE в активному центрі рецептора співпадає з положенням МК-8666 (рис. 3.1 (1) та рис. 3.2 (2)).

3.4 Дослідження утворення водневих зв'язків при взаємодії NSE з активним центром рецептору GPR40

Одним з параметрів, що можна отримати в результаті докінг-аналізу з використанням програми AutoDock Tools, є тип хімічного зв'язку ліганда з амінокислотними залишками протеїну – слабка електростатична взаємодія чи сильний водневий зв'язок. Наявність водневих зв'язків, як відомо, вказує на майже незворотною взаємодію ліганда з протеїном, що забезпечує більш сильний чи стабільний (в часі) контакт. Водневі зв'язки (Н-зв'язки) відіграють вирішальну роль в оптимізації взаємодії ліганд-білок і специфічності ліганда. На додаток до утворення стабільних Н-зв'язків у кінцевому зв'язаному стані, утворення тимчасових Н-зв'язків під час процесів зв'язування сприяє кінетиці зв'язування, яка визначає ліганд як швидкий або повільний зв'язувач, що також впливає на дію препарату [94].

Під час молекулярного докінгу за допомогою програми AutoDock Tools було виявлено, що лише NSE та референсний ліганд МК8666 здатен до утворення водневих зв'язків з амінокислотними залишками в активному центрі рецептору GPR40. Всі інші досліджені речовини взаємодіяли з активним центром GPR40 по типу слабкої електростатичної взаємодії.

Було виявлено, що NSE утворює водневі зв'язки з двома АК-залишками (ARG183 та ARG2258) активного центру GPR40 (модель рецептора – 5TZR) (рис. 3.3). При аналізі зв'язування NSE з моделлю рецептора 5TZY було виявлено утворення одного водневого зв'язку з GLU145 (рис. 3.4).

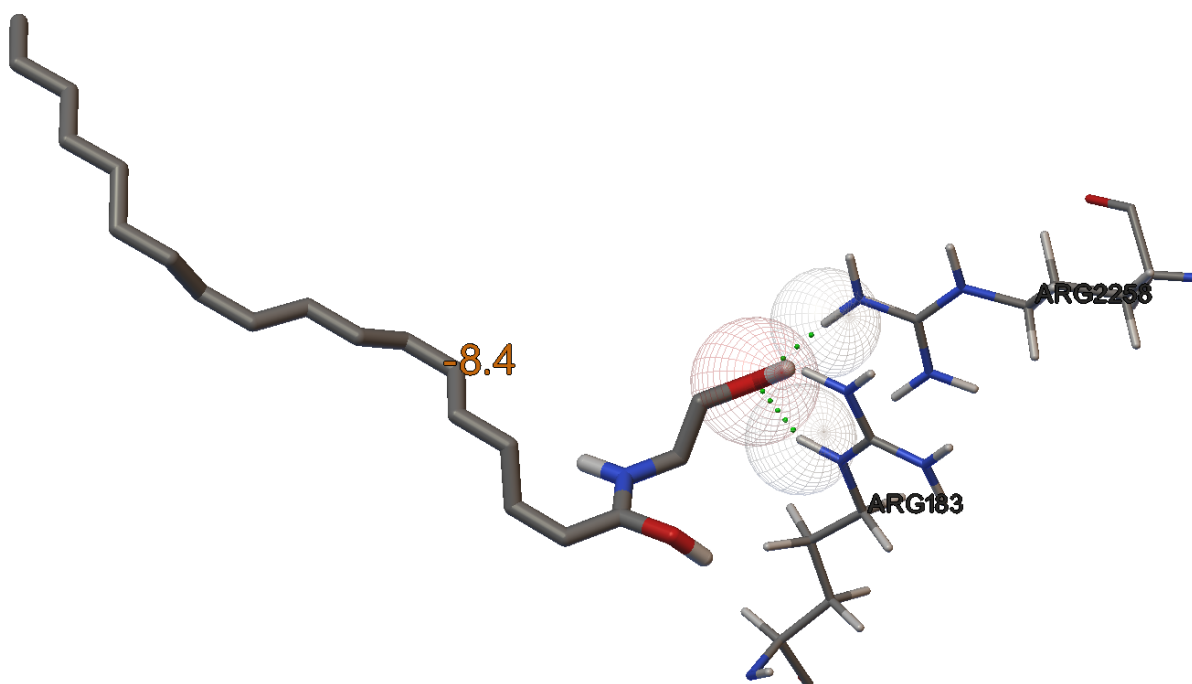


Рис. 3.3. Водневі зв'язки при взаємодії NSE з ліганд-зв'язуючим доменом рецептора GPR40 (структура 5TZR). Візуалізація у програмі AutoDockTools за допомогою функції 'Show Interaction/Hydrogen bonds'.

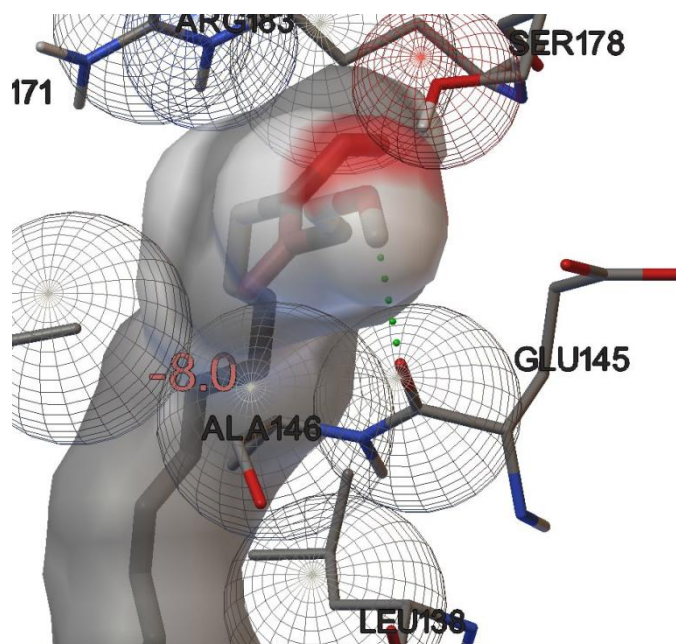


Рис. 3.4. Водневі зв'язки при взаємодії NSE з ліганд-зв'язуючим доменом рецептора GPR40 (структура 5TZY). Візуалізація у програмі AutoDockTools за допомогою функції 'Show Interaction/Hydrogen bonds'.

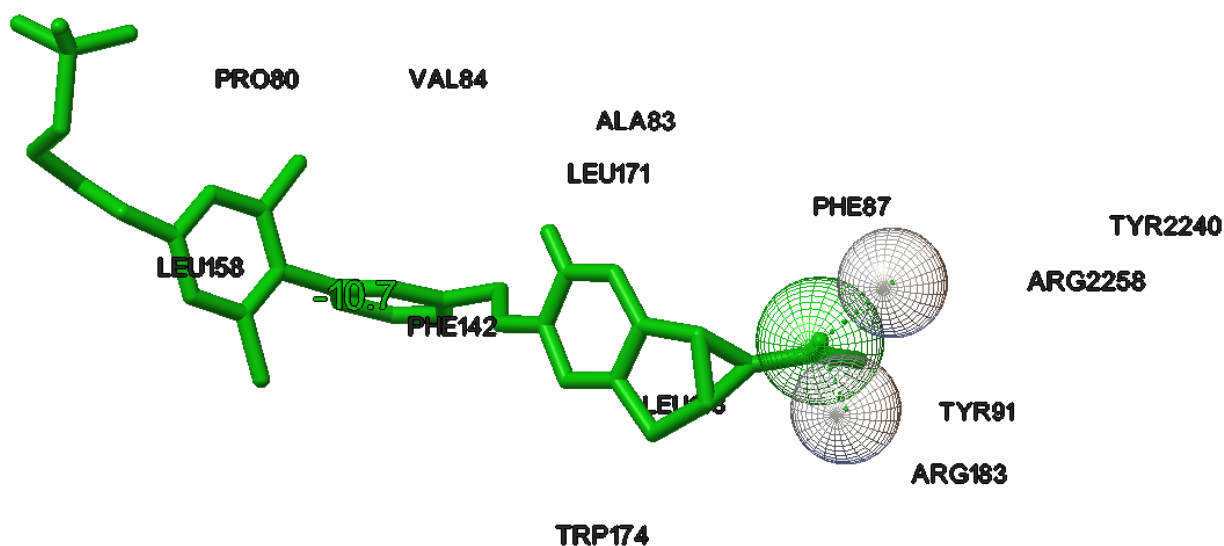


Рис. 3.5. Водневі зв'язки при взаємодії MK8666 з ліганд-зв'язуючим доменом рецептора GPR40 (структура 5TZR). Візуалізація у програмі AutoDockTools за допомогою функції 'Show Interaction/Hydrogen bonds'.

Референсний ліганд МК-8666 у випадку моделі 5TZR утворював два водневі зв'язки (ARG183 та ARG2258) (рис. 3.5), що співпадає з отриманими результатами для NSE.

Ці результати щодо типу взаємодії ліганд-рецептор можуть свідчити про те, що, серед всіх досліджених NAEs саме NSE можна розглядати як найбільш перспективний кандидат для проведення подальших досліджень *in vitro* та *in vivo* з метою створення на його основі лікарського засобу як агоніста рецептора GPR40.

ЗАКЛЮЧЕННЯ

Отже, отримані *in silico* методом молекулярного докінгу результати свідчать про зв'язування всіх досліджених NAEs з активним центром рецептора

GPR40. Найбільшу афінність при цьому демонструє лише насичений NAE 18:0 N-стеароїлетаноламін.

Тому є доцільним в подальшому дослідити взаємодію саме N-стеароїлетаноламіну з GPR40 в експериментах *in vivo* та *in vitro* з метою створення на його основі лікарських засобів – агоністів GPR40 для лікування діабету 2 типу.

В перспективі на підставі проведених *in silico*, *in vitro*, та *in vivo* досліджень планується провести доклінічні випробування N-стеароїлетаноламіну (на тваринах) в якості антидіабетичного лікарського засобу. В разі отримання позитивних результатів будуть проведені клінічні випробування створеного препарату.

ВИСНОВКИ

1. Методом молекулярного докінгу була показана здатність ряду сполук класу N-ацилетаноламінів зв'язуватись з активним центром протеїну GPR40.
2. Найкращу афінність до активного центру рецептору GPR40 проявляє N-стеароїлетаноламін (для моделі рецептора 5TZR: найменша вільна енергія зв'язування -8,4 ккал/моль, константа інгібування 0,696 мкмоль. А для моделі рецептора 5TZY: найменша вільна енергія зв'язування -8 ккал/моль, константа інгібування 1,368 мкмоль).
3. Отримані результати дозволяють припустити потенційну можливість використання N-стеароїлетаноламіну в якості агоніста GPR40 з метою лікування цукрового діабету 2 типу.
4. Отримані результати розширюють знання про біохімічні механізми біологічної дії NAEs та можуть бути використані для створення нового безпечного лікарського засобу з антидіабетичною дією.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Tsutomu Tomita, Kiminori Hosoda, Junji Fujikura, Nobuya Inagaki and Kazuwa Nakao. *The G-protein-coupled long-chain fatty acid receptor GPR40 and glucose metabolism*. Front. Endocrinol., 26 September 2014, Sec. Clinical Diabetes, Volume 5 - 2014 | <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00152>
2. American Diabetes Association. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care. 2014 Jan;37(Suppl 1):S81-90. doi: 10.2337/dc14-S081. PMID: 24357215.
3. World Health Organization. (2021, January 27). *Diabetes*. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.
4. Atkinson MA, Eisenbarth GS. *Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment*. Lancet. 2001 Nov 3;358(9295):221-9. doi: 10.1016/S0140-6736(01)05415-0. PMID: 11684200.
5. Katsarou A, Gudbjörnsdottir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, Jacobsen LM, Schatz DA, Lernmark Å. *Type 1 diabetes mellitus*. Nat Rev Dis Primers. 2017 Sep 7;3:17016. doi: 10.1038/nrdp.2017.16. PMID: 28880075.
6. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. *Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future*. Lancet. 2014 Jun 7;383(9922):1068-83. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62154-6. PMID: 24315620.
7. American Diabetes Association. (2021). *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. Diabetes Care, 44(Supplement_1), S15-S33. doi: 10.2337/dc21-s002.
8. Charles F. Burant. *Activation of GPR40 as a Therapeutic Target for the Treatment of Type 2 Diabetes*. Diabetes Care 2013;36(Supplement_2):S175–S179. <https://doi.org/10.2337/dcS13-2037>
9. Jensen MV, Joseph JW, Ronnebaum SM, Burgess SC, Sherry AD, Newgard CB. *Metabolic cycling in control of glucose-stimulated insulin secretion*. Am J Physiol Endocrinol Metab 2008;295:E1287–E1297

10. Newsholme P, Gaudel C, McClenaghan NH. *Nutrient regulation of insulin secretion and beta-cell functional integrity*. Adv Exp Med Biol 2010;654:91–114
11. Abdullah S Al-Goblan, Mohammed A Al-Alfi, and Muhammad Z Khan. *Mechanism linking diabetes mellitus and obesity*. Diabetes Metab Syndr Obes. 2014; 7: 587–591. Published online 2014 Dec 4. doi: 10.2147/DMSO.S67400
12. Lukas Schwingshackl, Georg Hoffmann, Anna-Maria Lampousi, Sven Knüppel, Khalid Iqbal, Carolina Schwedhelm, Angela Bechthold, Sabrina Schlesinger, and Heiner Boeing. *Food groups and risk of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of prospective studies*. Eur J Epidemiol. 2017; 32(5): 363–375. Published online 2017 Apr 10. doi: 10.1007/s10654-017-0246-y
13. John P. Kirwan, Jessica Sacks, and Stephan Nieuwoudt. *The essential role of exercise in the management of type 2 diabetes*. Cleve Clin J Med. Author manuscript; available in PMC 2018 Jul 1. Published in final edited form as: Cleve Clin J Med. 2017 Jul; 84(7 Suppl 1): S15–S21. doi: 10.3949/ccjm.84.s1.03
14. Valeriya Lyssenko, Leif Groop, and Rashmi B. Prasad. *Genetics of Type 2 Diabetes: It Matters From Which Parent We Inherit the Risk*. Rev Diabet Stud. 2015 Fall-Winter; 12(3-4): 233–242. Published online 2015 Nov 10. doi: 10.1900/RDS.2015.12.233
15. W D Strain, S V Hope, A Green, P Kar, J Valabhji, A J Sinclair. *Type 2 diabetes mellitus in older people: a brief statement of key principles of modern day management including the assessment of frailty*. A national collaborative stakeholder initiative. Diabet Med. 2018 Jul;35(7):838-845. doi: 10.1111/dme.13644. Epub 2018 May 6.
16. Rawshani A, Rawshani A, Franzén S, et al. *Risk factors, mortality, and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes*. N Engl J Med. 2018;379(7):633-644. doi: 10.1056/NEJMoa1800256

17. American Diabetes Association. 2. *Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021*. *Diabetes Care*. 2021;44(Suppl 1):S15-S33. doi: 10.2337/dc21-S002.
18. American Diabetes Association. *Standards of Medical Care in Diabetes-2021*. *Diabetes Care*. 2021 Jan;44(Suppl 1):S1-S232. doi: 10.2337/dc21-S000. PMID: 33298416.
19. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. *Diabetes Diet, Eating, & Physical Activity*. Accessed April 26, 2023. <https://www.niddk.nih.gov/health-information/diabetes/overview/diet-eating-physical-activity>
20. Mosenzon, O., Raz, I. *Incretin-Based Therapy for Type 2 Diabetes Mellitus*. *Nature Reviews Endocrinology*, (2019). 15(5), 263-279. doi: 10.1038/s41574-019-0157-8.
21. Davies, M. J., D'Alessio, D. A., Fradkin, J., Kernan, W. N., Mathieu, C., Mingrone, G., ... & Buse, J. B. *Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2018. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD)*. *Diabetes Care*, (2018). 41(12), 2669-2701.
22. Zelniker, T. A., Wiviott, S. D., Raz, I., Im, K., Goodrich, E. L., Bonaca, M. P., ... & Braunwald, E. *SGLT2 inhibitors for primary and secondary prevention of cardiovascular and renal outcomes in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cardiovascular outcome trials*. *The Lancet*, (2018). 393(10166), 31-39.
23. American Society for Metabolic and Bariatric Surgery. *Clinical practice guidelines for the perioperative nutritional, metabolic, and nonsurgical support of the bariatric surgery patient—2013 update: cosponsored by American Association of Clinical Endocrinologists, the Obesity Society, and American Society for Metabolic and Bariatric Surgery*. *Surgery for Obesity and Related Diseases*, (2017). 13(5), 727-734.

24. Rastogi A, Singh SK, Vats P. *In silico Investigation of N-Acylethanolamines as GPR40 Agonists for Antidiabetic Activity using Molecular Docking and Dynamics*. Sci Rep. 2018 Nov 26;8(1):17390. doi: 10.1038/s41598-018-35430
25. Li X., Yang X., Li L. et al. *Recent Advances in Nanoparticle-Mediated Delivery of Anti-Diabetic Drugs*. Journal of Drug Targeting. - 2021. - Vol. 29, Issue 1. - P. 1-10.
26. Gupta R. K., Kesari A. N. *Natural Anti-Diabetic Agents: A Review*. Scholars Journal of Applied Medical Sciences. - 2014. - Vol. 2, Issue 4. - P. 1082-1089.
27. Stein DT, Esser V, Stevenson BE, et al. *Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat*. J Clin Invest 1996;97:2728–2735
28. Chang-Chen KJ, Mullur R, Bernal-Mizrachi E. *Beta-cell failure as a complication of diabetes*. Rev Endocr Metab Disord 2008;9:329–343
29. Talchai C, Xuan S, Lin HV, Sussel L, Accili D. *Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure*. Cell 2012;150:1223–1234
30. McGarry JD, Brown NF. *The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis*. Eur J Biochem 1997;244:1–14
31. Nolan CJ, Madiraju MS, Delghingaro-Augusto V, Peyot ML, Prentki M. *Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion*. Diabetes 2006;55(Suppl. 2):S16–S23
32. Roduit R, Nolan C, Alarcon C, et al. *A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli*. Diabetes 2004;53:1007–1019
33. Larsson O, Deeney JT, Bränström R, Berggren PO, Corkey BE. *Activation of the ATP-sensitive K^+ channel by long chain acyl-CoA. A role in modulation of pancreatic beta-cell glucose sensitivity*. J Biol Chem 1996;271:10623–10626

34. Tarasov A, Dusonchet J, Ashcroft F. *Metabolic regulation of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K⁺ channel: a pas de deux*. Diabetes 2004;53(Suppl. 3):S113–S122[PubMed]
35. Peter-Riesch B, Fathi M, Schlegel W, Wollheim CB. *Glucose and carbachol generate 1,2-diacylglycerols by different mechanisms in pancreatic islets*. J Clin Invest 1988;81:1154–1161
36. Briscoe CP, Tadayon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, Eilert MM, Ellis C, Elshourbagy NA, Goetz AS, Minnick DT, Murdock PR, Sauls HR, Jr, Shabon U, Spinage LD, Strum JC, Szekeres PG, Tan KB, Way JM, Ignar DM, Wilson S, Muir AI. *The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids*. The Journal of biological chemistry. 2003;278(13):11303–11311.
37. Mancini AD, Poitout V. *The fatty acid receptor FFA1/GPR40 a decade later: how much do we know?* Trends Endocrinol Metab. 2013;24(8):398–407.
38. Gras D, Chanez P, Urbach V, Vachier I, Godard P, Bonnans C. *Thiazolidinediones induce proliferation of human bronchial epithelial cells through the GPR40 receptor*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2009;296(6):L970–978.
39. Mohammad S. *GPR40 Agonists for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus: Benefits and Challenges*. Curr Drug Targets. 2015
40. Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, Ogi K, Hosoya M, Tanaka Y, Uejima H, Tanaka H, Maruyama M, Satoh R, Okubo S, Kizawa H, Komatsu H, Matsumura F, Noguchi Y, Shinohara T, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M. *Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40*. Nature. 2003;422(6928):173–176.
41. Steneberg P, Rubins N, Bartoov-Shifman R, Walker MD, Edlund H. *The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse*. Cell Metab. 2005;1(4):245–258.

42. Nagasumi K, Esaki R, Iwachidow K, Yasuhara Y, Ogi K, Tanaka H, Nakata M, Yano T, Shimakawa K, Taketomi S, Takeuchi K, Odaka H, Kaisho Y. *Overexpression of GPR40 in pancreatic beta-cells augments glucose-stimulated insulin secretion and improves glucose tolerance in normal and diabetic mice*. *Diabetes*. 2009;58(5):1067–1076.
43. Briscoe CP, Peat AJ, McKeown SC, Corbett DF, Goetz AS, Littleton TR, McCoy DC, Kenakin TP, Andrews JL, Ammala C, Fornwald JA, Ignar DM, Jenkinson S. *Pharmacological regulation of insulin secretion in MIN6 cells through the fatty acid receptor GPR40: identification of agonist and antagonist small molecules*. *Br J Pharmacol*. 2006;148(5):619–628.
44. Vettor R, Granzotto M, De Stefani D, Trevellin E, Rossato M, Farina MG, Milan G, Pilon C, Nigro A, Federspil G, Vigneri R, Vitiello L, Rizzuto R, Baratta R, Frittitta L. *Loss-of-function mutation of the GPR40 gene associates with abnormal stimulated insulin secretion by acting on intracellular calcium mobilization*. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(9):3541–3550.
45. Poitout V, Lin DC. *Modulating GPR40: therapeutic promise and potential in diabetes*. *Drug Discov Today*. 2013;18(23–24):1301–1308.
46. Mancini AD, Poitout V. *The fatty acid receptor FFA1/GPR40 a decade later: how much do we know?* *Trends Endocrinol Metab*. 2013;24(8):398–407.
47. Luo J, Swaminath G, Brown SP, Zhang J, Guo Q, Chen M, Nguyen K, Tran T, Miao L, Dransfield PJ, Vimolratana M, Houze JB, Wong S, Toteva M, Shan B, Li F, Zhuang R, Lin DC. *A potent class of GPR40 full agonists engages the enteroinsular axis to promote glucose control in rodents*. *PLoS One*. 2012;7(10):e46300.
48. Lan H, Hoos LM, Liu L, Tetzloff G, Hu W, Abbondanzo SJ, Vassileva G, Gustafson EL, Hedrick JA, Davis HR. *Lack of FFAR1/GPR40 does not protect mice from high-fat diet-induced metabolic disease*. *Diabetes*. 2008;57(11):2999–3006.

49. Shuibang Wang, Edward J. Dougherty, and Robert L. Danner. *PPAR γ Signaling and Emerging Opportunities for Improved Therapeutics*. Pharmacol Res. 2016 Sep; 111: 76–85. Published online 2016 Jun 4. doi: 10.1016/j.phrs.2016.02.028
50. Civelli O. *GPCR deorphanizations: the novel, the known and the unexpected transmitters*. Trends Pharmacol Sci 2005;26:15–19
51. Morgan NG, Dhayal S. *G-protein coupled receptors mediating long chain fatty acid signalling in the pancreatic beta-cell*. Biochem Pharmacol 2009;78:1419–1427
52. Sawzdargo M, George SR, Nguyen T, Xu S, Kolakowski LF, O'Dowd BF. *A cluster of four novel human G protein-coupled receptor genes occurring in close proximity to CD22 gene on chromosome 19q13.1*. Biochem Biophys Res Commun 1997;239:543–547
53. Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, et al. *The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids*. J Biol Chem 2003;278:11303–11311
54. Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, et al. *Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40*. Nature 2003;422:173–176
55. Fujiwara K, Maekawa F, Yada T. *Oleic acid interacts with GPR40 to induce Ca²⁺ signaling in rat islet beta-cells: mediation by PLC and L-type Ca²⁺ channel and link to insulin release*. Am J Physiol Endocrinol Metab 2005;289:E670–E677
56. Briscoe CP, Peat AJ, McKeown SC, et al. *Pharmacological regulation of insulin secretion in MIN6 cells through the fatty acid receptor GPR40: identification of agonist and antagonist small molecules*. Br J Pharmacol 2006;148:619–628
57. Salehi A, Flodgren E, Nilsson NE, et al. *Free fatty acid receptor 1 (FFA(1)R/GPR40) and its involvement in fatty-acid-stimulated insulin secretion*. Cell Tissue Res 2005;322:207–215

58. Alquier T, Peyot ML, Latour MG, et al. *Deletion of GPR40 impairs glucose-induced insulin secretion in vivo in mice without affecting intracellular fuel metabolism in islets*. Diabetes 2009;58:2607–2615
59. Nagasumi K, Esaki R, Iwachidow K, et al. *Overexpression of GPR40 in pancreatic beta-cells augments glucose-stimulated insulin secretion and improves glucose tolerance in normal and diabetic mice*. Diabetes 2009;58:1067–1076
60. Ferdaoussi M, Bergeron V, Zarrouki B, et al. *G protein-coupled receptor (GPR)40-dependent potentiation of insulin secretion in mouse islets is mediated by protein kinase D1*. Diabetologia 2012;55:2682–2692
61. Kashyap S, Belfort R, Gastaldelli A, et al. *A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes*. Diabetes 2003;52:2461–2474
62. Steneberg P, Rubins N, Bartoov-Shifman R, Walker MD, Edlund H. *The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse*. Cell Metab 2005;1:245–258
63. Kebede M, Alquier T, Latour MG, Semache M, Tremblay C, Poitout V. *The fatty acid receptor GPR40 plays a role in insulin secretion in vivo after high-fat feeding*. Diabetes 2008;57:2432–2437
64. Lan H, Hoos LM, Liu L, et al. *Lack of FFAR1/GPR40 does not protect mice from high-fat diet-induced metabolic disease*. Diabetes 2008;57:2999–3006
65. Latour MG, Alquier T, Oseid E, et al. *GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo*. Diabetes 2007;56:1087–1094
66. Alquier T, Poitout V. *GPR40: good cop, bad cop?* Diabetes 2009;58:1035–1036
67. Kotarsky K, Nilsson NE, Flodgren E, Owman C, Olde B. *A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs*. Biochem Biophys Res Commun 2003;301:406–410

68. Tan CP, Feng Y, Zhou YP, et al. *Selective small-molecule agonists of G protein-coupled receptor 40 promote glucose-dependent insulin secretion and reduce blood glucose in mice.* Diabetes 2008;57:2211–2219
69. Negoro N, Sasaki S, Ito M, et al. *Identification of fused-ring alkanolic acids with improved pharmacokinetic profiles that act as G protein-coupled receptor 40/free fatty acid receptor 1 agonists.* J Med Chem 2012;55:1538–1552
70. Tsujihata Y, Ito R, Suzuki M, et al. *TAK-875, an orally available G protein-coupled receptor 40/free fatty acid receptor 1 agonist, enhances glucose-dependent insulin secretion and improves both postprandial and fasting hyperglycemia in type 2 diabetic rats.* J Pharmacol Exp Ther 2011;339:228–237
71. Naik H, Vakilynejad M, Wu J, et al. *Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamic properties of the GPR40 agonist TAK-875: results from a double-blind, placebo-controlled single oral dose rising study in healthy volunteers.* J Clin Pharmacol 2012;52:1007–1016
72. Leifke E, Naik H, Wu J, et al. *A multiple-ascending-dose study to evaluate safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of a novel GPR40 agonist, TAK-875, in subjects with type 2 diabetes.* Clin Pharmacol Ther 2012;92:29–39
73. Burant CF, Viswanathan P, Marcinak J, et al. *TAK-875 versus placebo or glimepiride in type 2 diabetes mellitus: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial.* Lancet 2012;379:1403–1411
74. Matsuda M, DeFronzo RA. *Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp.* Diabetes Care 1999;22:1462–1470
75. Matias I, Marzo. Di. *Endocannabinoids and the control of energy balance.* Trends. Endocrinol. Metab. – 2007. – V. 18(1). – P. 27 – 37.
76. Hansen, H. S., & Diep, T. A. *N-acyl ethanolamines and the regulation of feeding behavior: focus on anandamide and oleoylethanolamide.* Current Pharmaceutical Design, (2009). 15(14), 2614-2622.

77. Di Marzo, V. *Endocannabinoids: synthesis and degradation. Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, (2008). 160, 1-24.
78. R. Roche, L. Hoareau, S. Bes-Houtmann [et al.] *Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. Histochem. Cell. Biol.* – 2006. – V. 126(2). – P. 177 – 187.
79. D. Osei-Hyiaman, M. DePetrillo, P. Pacher [et al.] *Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. J. Clin. Invest.* – 2005. – V. 115(5). – P. 1298 – 1305.
80. Fu, J., et al. *Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- α* . *Nature*, (2003). 425(6953), 90-93.
81. Starowicz, K., & Di Marzo, V. *Non-CB1, non-CB2 receptors for endocannabinoids, plant cannabinoids, and synthetic cannabimimetics: focus on G-protein-coupled receptors and transient receptor potential channels. Journal of Neuroimmune Pharmacology*, (2008). 3(1), 25-37.
82. Fu, J., et al. *Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- α* . *Nature*, (2003). 425(6953), 90-93.
83. O'Sullivan, S. E. *Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. British Journal of Pharmacology*, (2007). 152(5), 576-582.
84. Maccarrone, M., et al. *The endocannabinoid system and its relevance for nutrition. Annual Review of Nutrition*, (2010). 30, 423-440.
85. Tukalenko E., Tubaltseva I., Kosiakova H., Horid'ko T., Berdyshev A., Meged O., Dzuba O., Makarchuk M., Hula N. *Rats' nociception under N-stearoylethanolamine administration in obesity-induced insulin resistant rats. Abstract of "Psychophysiological and visceral functions in norm and pathology". VIII International scientific conference dedicated to 175-years anniversary of Depart-*

ment of Physiology and Anatomy, Taras Shevchenko National University of Kyiv, Oct. 17-20, 2017, Kyiv, Ukraine, -P. 17.

86. Onopchenko O., Kosiakova G., Gula N. *Corrective effect of N-stearoylethanolamine on pancreas phospholipid imbalance in rats with obesity-induced insulin resistance*. 40th FEBS Congress The biochemical Basis of Life / FEBS Journal. – 2015.– 282(Suppl. 1) . – P. 12009.

87. Dziuba O.S., Hudz Ie. A., Kosiakova G.V., Klimashevsky V.M., Gula N.M. Cholesterol content and phospholipid composition in adipocytes of rats with obesity-induced and its changes after N-stearoylethanolamine administration // Ukr. Biochem. J. - 2017. - V. 89, Special Issue. - P. 660.

88. Dziuba O.S., Hudz Ie. A., Kosiakova H. V., Horid'ko T. M., Klimashevsky V. M., Hula N. M. *The effect of N-stearoylethanolamine on adipocytes free cholesterol content and phospholipid composition in rats with obesity-induced insulin resistance*. Ukr. Biochem. J . -2018. - V. 90, N5. - P. 81 - 90. <https://doi.org/10.15407/ubj90.05.081>

89. Onopchenko O.V. , Kosiakova G.V. , Gula N.M. *N-stearoylethanolamine improves indicators of insulin resistance development under high-fat diet overload*. 83rd EAS Congress 2015 / Atherosclerosis - 2015. 241. - N1.- P. e226.

90. A W Krug, P Vaddady, R A Railkar, B J Musser, J Cote. *Leveraging a Clinical Phase Ib Proof-of-Concept Study for the GPR40 Agonist MK-8666 in Patients With Type 2 Diabetes for Model-Informed Phase II Dose Selection*. Clin Transl Sci. 2017 Sep;10(5):404-411. doi: 10.1111/cts.12479. Epub 2017 Jul 20.

91. Bachmann KA, Lewis JD. *Predicting inhibitory drug-drug interactions and evaluating drug interaction reports using inhibition constants*. Ann Pharmacother 2005;39:1064-72. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15886285/>

92. Пат. 104650 UA, МПК А 61Р 31/12 (2006.01), А 61 К 31/164 (2006.01) *Застосування N-стеароїлетаноламіну як речовини з активною антигрипозною, антивірусною, антинеїрамінідазною, інтерфероніндукуючою та антигемаглютинуючою дією та засіб для профілактики та лікування грипозної*

інфекції / Гула Н.М., Асмолкова В.С., Рибалко В.Л., Дядюн С.Т., Старосила Д.Б., Комісаренко С.В., Чумак А.А., Бердишев А.Г. Оуб. Бюл.№4, 25.02.2014.

93. Звіт про доклінічні дослідження №Івс-17. ТОВ «НВП «УКРОПГ-СИНТЕЗ» Біоаналітична лабораторія (БАЛ). Київ.-2017.

94. Yu-ming M Huang, Myungshim Kang, Chia-en A Chang. *Switches of hydrogen bonds during ligand-protein association processes determine binding kinetics*. J Mol Recognit. 2014 Sep;27(9):537-48. doi: 10.1002/jmr.2377.