

Вплив блокади клітинних протейніназ на обмін речовин при експериментальному цукровому діабеті

С.В. Зяблицев¹, К.О. Усенко¹, О.В. Добровинська², Ю.В. Перепелиця¹,
В.А. Андрущенко¹

¹Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ;

²Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України, Київ;
e-mail: zsv1965@gmail.com

Відомо, що для попередження та/або лікування діабетичних ускладнень перспективним є застосування інгібіторів рецепторних протейніназ (ІПК). Метою дослідження було вивчення впливу ІПК на стан вуглеводного, ліпідного та білкового обміну при експериментальних моделях цукрового діабету 1-го (ЦД1) і 2-го (ЦД2) типів. ЦД1 моделювали у щурів-самців лінії Вістар введенням стрептозотоцину (50 мг/кг), ЦД2 – тривалим (180 діб) утримуванням на висококалорійній жировій дієті (ВЖД; 56,7% жиру), а також введенням стрептозотоцину (25 мг/кг) на тлі ВЖД. Для лікування застосований інсулін (“Actrapid Novo Nordisk”, Данія), який комбінували з ІПК сорафенібом (“Cipla”, Індія) перорально у вигляді саше (150 мг/кг). Незалежно від типу дієти введення стрептозотоцину призводило до гіперглікемії, втрати маси тіла, глюкозо- і кетонурії, поліурії і полідипсії. Гіршими ці прояви були у тварин з ВЖД, в яких летальність сягала 53,3% (при моделюванні ЦД1 – 12%), що можна пояснити розвитком печінкової недостатності. На тлі ВЖД незначна гіперглікемія була відмічена тільки на 150-ту добу. Обидві моделі ЦД супроводжувалися значними гіперхолестеринемією і гіперліпідемією. Додавання до ВЖД глюкози збільшувало вміст холестерину. ВЖД зумовлювала гіпопротейнемію, сприяла пригніченню обміну речовин, збільшенню активності трансаміназ. Встановлені порушення значною мірою відновлювалися при застосуванні ІПК: зменшувалися рівень глікемії і втрата маси тіла, вміст тригліцеридів і ліпопротейдів дуже низької щільності, збільшувався вміст ліпопротейдів високої щільності і нормалізувався пігментний обмін.

Ключові слова: гіперглікемія; жирова дієта; стрептозотоцин; стеатогепатоз; гіпопротейнемія; гіперхолестеринемія; гіпертригліцеридемія

ВСТУП

Цукровий діабет (ЦД) набуває ознак світової пандемії внаслідок постійного зростання захворюваності як на ЦД 1-го (ЦД1) [1], так і 2-го (ЦД2) [2] типів. Понад 90–95% усіх випадків діабету припадає на ЦД2, або інсулінонезалежний діабет. Він є складним метаболічним розладом зі змінами ліпідного обміну, резистентністю до інсуліну та дисфункцією β-клітин підшлункової залози. Важливий фактор ризику ЦД2 – ожиріння, яке супроводжується підвищенням вмісту у крові тригліцеридів та інсулінорезистентністю [3].

© Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, 2024

© Видавець ВД “Академперіодика” НАН України, 2024

Експериментальне відтворення ЦД широко використовується у доклінічних дослідженнях [4]. Більшість тваринних моделей індукції діабету застосовують токсичні хімічні речовини, які діють на β-клітини підшлункової залози, наприклад, аллоксан або стрептозотоцин [5]. Високі дози останнього незворотно порушують секрецію інсуліну, викликаючи абсолютну інсулінову недостатність подібну до ЦД1. Низькі дози стрептозотоцину викликають легке порушення секреції інсуліну, що на тлі ожиріння супроводжується розвитком інсулінорезистентності, яка є головною

ланкою патогенезу ЦД2 [6]. Експериментальні дані показали, що стрептозоточин через 60 діб після введення знищував β -клітини підшлункової залози, викликав гіперглікемію, окисний стрес та резистентність до інсуліну [7]. За результатами біохімічного дослідження виявлено гепатоцелюлярне пошкодження, гіперліпідемію, підвищення вмісту глікованого гемоглобіну та порушення інсулінового сигнального шляху.

У розвитку клітинних порушень при ЦД важливе значення має активація протеїнкіназних сигнальних механізмів [8, 9]. Наприклад, при діабетичній ретинопатії (ДР) активація каскаду мітогенактивована кіназа/позаклітинна сигналзалежна кіназа (МАРК/ERK) може індукувати надмірну експресію васкулоендотеліального фактора росту (VEGF) [10].

У наших попередніх дослідженнях було встановлено попередження розвитку мікроангіопатії сітківки при стрептозоточиніндукованому діабеті у щурів введенням низкомолекулярного блокатора тирозинових протеїнкіназ іматинібу [11]. Цей ефект реалізувався через гальмування надекспресії VEGF і гіпоксіїндукованого фактора α (HIF-1 α), а також, як показано у інших наших працях, був пов'язаний з пригніченням апоптозу [12], реакцій мікро- і макроглії [13]. Білок-інгібітор кінази Raf-1 попереджав розвиток діабетичної нейродегенерації сітківки через гальмування P38-МАРК [14].

Застосування інгібіторів рецепторних претеїнкіназ (ІПК) для доповнення традиційних схем лікування ДР із застосуванням анти-VEGF-терапії визнано одним з перспективних напрямків [15]. Використання біоінформаційного підходу до перепрофілювання ліків на підставі аналізу молекулярних, клітинних та імунологічних механізмів неоваскуляризації при ДР визначило застосування ІПК новим потенційним варіантом імуномодельючої терапії [16].

Метою дослідження було вивчення впливу ІПК на стан вуглеводного, ліпідного та

білкового обміну при експериментальних моделях цукрового діабету 1-го (ЦД1) і 2-го (ЦД2) типів.

МЕТОДИКА

При виконанні роботи керувалися нормами та принципами Директиви 2010/63 ЄС із захисту тварин, Гельсінкської декларації (2008) та вимогами Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 1759-VI від 15.12.2009). Щурів-самців лінії Вістар до досягнення 3-місячного віку тримали у віварії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (Київ) за умов вільного доступу до їжі і води. Раціон віварію включав годування стандартним гранульованим комбікормом для лабораторних тварин ПК 120-1 (ПП «РЕЗОН-1», Київська обл., с. Віта-Почтова). Корм мав калорійну цінність 3295 ккал/кг, частка жирів становила 6,3%.

Надалі тварин рандомізовано поділили на 4 групи. Щурів 1-ї групи (контроль, $n = 20$) продовжували годувати стандартним раціоном. Тваринам 2-ї групи ($n = 25$) моделювали ЦД1 одноразовим внутрішньоочеревинним введенням стрептозоточину (50 мг/кг; “Sigma-Aldrich”, Китай), розчиненого у холодному 0,1 М цитратному буфері (рН 4,5) [5, 11]. Протягом 16 год до ін'єкції тварин не годували, а впродовж 24 год після неї поїли 5%-м розчином глюкози. Кожні 3 доби контролювали рівень глікемії за допомогою глюкометра та одноразових тест-смужок (“ACCU-Chek Instant”, Німеччина) у крові, забраної з хвостової вени натще. Тільки у 4 тварин (16%) стрептозоточин не індукував гіпеглікемію, в решти вміст глюкози був вищим за 12 ммоль/л протягом усього спостереження. На 5–7-му добу 3 тварини (12%), які мали значну гіперглікемію (вище ніж 27,5 ммоль/л), загинули. Впродовж експерименту відмічено значні полідипсію та поліурію, а також глюкозурію і кетонурію: не менш 14 і 3,9 ммоль/л від-

повідно (в нормі – відсутні; визначено за допомогою тест-смужок “CITOLAB”, ООО «Фармаско», Україна). Такі результати дали змогу константувати розвиток у тварин стрептозототиндукованого діабету з кетозом, що можна вважати адекватною моделлю ЦД1. Тварин цієї групи (18 особин) виводили з експерименту на 90-ту добу після введення стрептозототину.

Тваринам 3-ї групи ($n = 35$) моделювали ЦД2 застосуванням висококалорійної жирової дієти, збагаченої легкозасвоюваними вуглеводами (фруктоза) [17, 18]. Суміш для годування виготовляли змішуванням подрібненого комбікорму (55,6%), перетопленого свинячого сала (33,3%) і фруктози (11,1%; “ADM® Crystalline Fructose C”, Болгарія). Виходячи з того, що калорійність перетопленого свинячого жиру становить 896 ккал, фруктози – 400 ккал [19], отримана суміш мала 5260 ккал/кг, з яких частка жиру (насичені жирні кислоти) – 56,7%. У середньому за добу тварини отримували збагачену жиром суміш з розрахунку 200 г/кг, що у перерахунку на калорії становило 1052 ккал/кг маси тіла за добу. Летальності протягом експерименту відмічено не було. Тварин цієї групи виводили з експерименту через 120 (5 особин), 150 (10 особин) і 180 днів (20 особин).

Тварин 4-ї групи ($n = 30$) витримували на жировій дієти аналогічно до 3-ї групи. На 150-ту добу їм вводили стрептозототин за методикою, наведеною для 2-ї групи, але дозу препарату знижували до 25 мг/кг [7, 17]. Після введення стрептозототину стан тварин різко погіршувався, відмічали значну гіперглікемію (вміст глюкози не менше ніж 17,5 ммоль/л), затьмарення свідомості, поліурію, полідипсію, глюкозурію і кетонурію. Протягом першого тижня загинуло 16 (53,3%) тварин. Решту тварин 4-ї групи (14 особин) виводили з експерименту через 180 днів.

Тварин 2-ї і 4-ї груп рандомізовано розподіляли на три підгрупи: 1-ша – плацебо-контроль (введення фізіологічного розчину);

2-га – лікування інсуліном короткої дії (“Actrapid HM Penfill”, Данія) – внутрішньоочеревинно у дозі 30 Од через день; 3-тя – до застосування інсуліну за вказаною схемою додавали щоденне введення *per os* ПК у вигляді саше – водного розчину препарату сораніб (сорафеніб 200 мг; “Cipla”, Індія.) у дозі 50 мг/кг. Лікування тварин 2-ї групи проводили з 60-ї до 90-ї доби, у 4-й – із 150-ї до 180-ї доби.

Тварин 3-ї групи також розподілили на 3 підгрупи: 1-ша – плацебо-контроль; у 2-й досліджували вплив навантаження глюкозою, яку додавали до жирового раціону у кількості 100 г/кг жирової суміші, починаючи з 120-ї доби годування жировою сумішшю; у 3-й вводили сораніб за наведеною вище схемою із 150-ї до 180-ї доби. Інсулін тваринам цієї групи не застосовували.

Протягом експерименту щотижнево визначали масу тварин та вміст глюкози у хвостовій вені. Щурів виводили з експерименту під глибоким тіопенталовим наркозом, у сироватці крові колориметричним методом за допомогою реактивів “Roshe Diagnostics” (США) та біохімічного аналізатора Cobas c311 (Німеччина) визначали вміст глюкози, холестерину, ліпопротеїдів високої (ЛПВЩ), низької (ЛПНЩ) і дуже низької (ЛПДНЩ) щільності, тригліцеридів, загального білка, альбуміну, сечовини, кретиніну, загального, прямого і непрямого білірубіну, активності трансаміназ – аланінамінотрансферази (АлАТ) і аспартатамінотрансферази (АсАТ).

Для статистичного аналізу застосовували програмне забезпечення Statistica 10 («StatSoft, Inc.», США). Розраховували середнє та їхню стандартну похибку. Перевірку на нормальний розподіл у варіаційних рядах проводили за допомогою тесту Шапіро-Уїлка. Вибіркові середні порівнювали із застосуванням дисперсійного аналізу (ANOVA), вірогідними вважали значення $P < 0,05$. Феномену множинного порівняння уникали, застосовуючи поправку Бонфероні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За рівнем глікемії всі дослідні групи показали позитивну динаміку, яка була більш різко виражена у 2-й групі при моделювання ЦД1 (рис. 1, а). Введення стрептозотоцину, як було нами показано і раніше [11], вже з 2-3-ї доби супроводжувалося збільшенням вмісту цукру у крові, діурезу та іншими ознаками гіперглікемії. На 90-ту добу спостереження глікемія була не меншою за 14,3 ммоль/л (у середньому $25,33 \pm 1,56$ ммоль/л). Тварини втрачали масу (див. рис. 1, б), яка в підгрупі плацебо-контролю була на 19,6% меншою ($P < 0,05$), ніж у тварин, що знаходилися на звичайному раціоні та не отримували стрептозотоцину або не перебували на жировій дієті. Введення інсуліну сприяло зменшенню рівня глікемії, а комбіноване його застосування з ІПК знижувало вміст глюкози ще істотніше (на 34,6 і 54,4% відповідно; $P < 0,05$). Також застосування препаратів запобігало втраті маси у тварин (див. рис. 1, б).

У 3-й групі застосування моделі ЦД2, що передбачало тривалу жирову дієту, також призводило до збільшення глікемії, хоча перші достеменні зсуви було відмічено тільки через 150 діб її вживання (див. рис. 1, а). Приріст вмісту глюкози в цей термін порівняно з контролем сягав 14,8% ($P < 0,05$). Ще більший рівень глікемії був через 180 діб – приріст становив 34,5% ($P < 0,05$). Маса тварин у цей термін суттєво збільшувалася (на 31,0%; $P < 0,05$), що було очікувано у зв'язку з великою калорійністю жирової дієти.

Введення інсуліну або цукрознижувальних препаратів тваринам цієї групи ми не проводили, оскільки не отримали значного збільшення вмісту глюкози у крові. Натомість застосування ІПК призвело до суттєвого зменшення рівня глікемії, при чому не тільки порівняно зі зниженням у тварин, що знаходилися на жировій дієті, але й 1-ю контрольною групою на 45,1 і 26,2% відповідно ($P < 0,05$ для обох випадків). Останній результат обґрунтовував необхідність окремого

вивчення впливу на стан вуглеводного обміну тривалого введення ІПК тваринам без таких зовнішніх впливів, як введення стрептозотоцину та/або перебування на жировій дієті. Відповідно до відновлення вуглеводного обміну, ІПК достеменно (на 8,2%; $P < 0,05$) знижував масу, порівняно зі значеннями у тварин, що не отримували лікування (див. рис. 1, б).

У 4-й групі з введенням стрептозотоцину тваринам, що знаходилися на жировій дієті, крім значного збільшення рівня глікемії (див. рис. 1, а), ми спостерігали високу летальність. Вже через 2 доби після ін'єкції тварини ставали млявими, свідомість і орієнтовно-рухова активність суттєво знижувалися, вони переставали доглядати за собою, значно збільшилися діурез, глікозурія і кетонурія, що відповідало симптомам кетоацидотичної

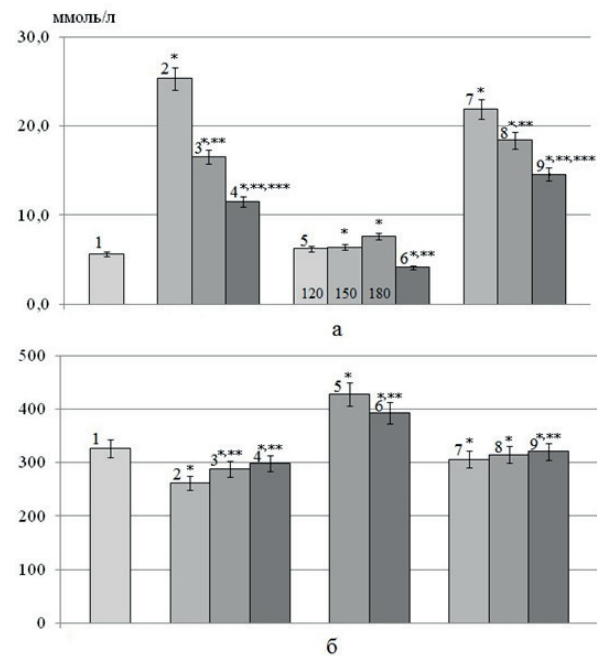


Рис. 1. Рівень глікемії (а) та маса тіла (б) у контрольній групі (1), у групах із введенням стрептозотоцину (2–4), з жировою дієтою (5, 6) і жировою дієтою зі стрептозотоцином (7–9); 2, 7 – підгрупи плацебо-контролю, 3, 8 – підгрупи з інсуліном, 4, 9 – підгрупи з інсуліном та інгібітором протеїнкінази (ІПК); 5, 6 – підгрупи плацебо-контролю та ІПК відповідно; на I 120, 150, 180 – доби експерименту; * $P < 0,05$ порівняно з контролем; ** $P < 0,05$ порівняно з плацебо-контролем; *** $P < 0,05$ порівняно з введенням інсуліну

ками. Протягом першого тижня загинуло 53,3% тварин. Слід зазначити, що і у 2-й групі при моделюванні ЦД1 спостерігалася загибель 12% тварин, у аналогічному за методикою дослідженні рівень летальності сягав 13,3% [11]. Варто також врахувати, що тваринам з жирною дієтою ми вводили меншу дозу препарату, ніж інтактним (25 щодо 50 мг/кг відповідно).

Отже, можна вважати, що стрептозотоцин-індукована гіперглікемія на тлі жирної дієти суттєво погіршувала стан тварин, призводячи до швидкого розвитку симптомів гіперглікемічної коми. Застосування інсуліну та особливо ІПК сприяло зниженню рівня глікемії на 16 і 33,5% відповідно ($P < 0,05$ у обох випадках). Після введення стрептозотоцину тваринам, які перебували на жирній дієті, подальшого приросту маси не спостерігали (див. рис. 1, б).

Таким чином, застосування різних моделей ЦД сприяло збільшенню рівня глікемії, що було значно виражено після введення стрептозотоцину, тоді як тривале витримування тварин на жирній дієті супроводжувалося відносно невеликим збільшенням вмісту глюкози у крові.

Визначення показників жирового обміну у 2-й групі при моделюванні ЦД1 (рис. 2, а) показало значне збільшення вмісту холестерину (у 1,4 раза; $P < 0,05$), тригліцеридів (у 1,7 раза; $P < 0,05$) та ЛПДНЩ (у 3,5 раза; $P < 0,05$) порівняно з контролем, що могло віддзеркалювати активацію ліполізу в інсулінозалежних тканинах [6]. Введення інсуліну з ІПК відрізнялося від підгрупи плацебо-контролю достеменно більшим вмістом ЛПВЩ (у 1,2 раза; $P < 0,05$). Зсуви інших показників були статистично незначущі.

Результати, що було отримано у підгрупах шурів з введенням тільки інсуліну за більшістю показників займали проміжне положення між іншими підгрупами і для полегшення сприйняття матеріалу на рис. 2 не наведено.

У тварин 3-ї групи, що тривало перебували на жирній дієті (див. рис. 2, б), відмічено суттєве збільшення у крові вмісту холесте-

рину (у 1,9 раза; $P < 0,05$) та всіх показників ліпідного обміну порівняно з контролем. Застосування ІПК сприяло однаковому збільшенню порівняно з плацебо-контролем ЛПВЩ і ЛПНЩ (у 1,3 раза; $P < 0,05$) при зниженні вмісту тригліцеридів (у 1,6 раза; $P < 0,05$) і ЛПДНЩ (удвічі; $P < 0,05$).

У 4-й групі на тлі введення стрептозотоцину тваринам, що перебували на жирній дієті, відмічено збільшення вмісту холестерину (у 1,9 раза; $P < 0,05$) та всіх інших

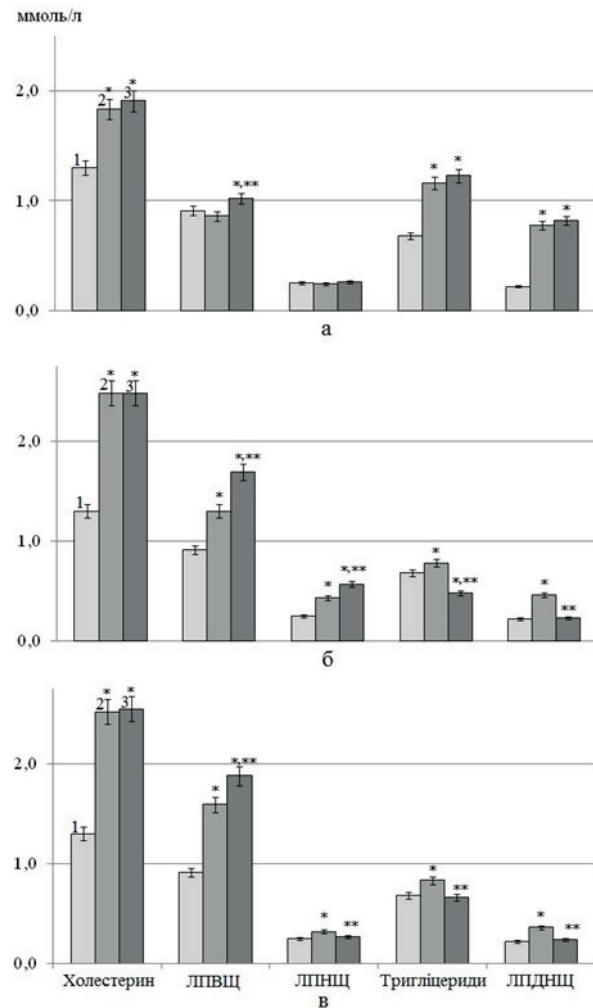


Рис. 2. Показники жирового обміну у шурів контрольної (1) та експериментальних груп: а – введення стрептозотоцину (2) та інсуліну з інгібітором протеїнкіназ (ІПК) (3); б – жирова дієта (2) та введення ІПК (3); в – жирова дієта з введенням стрептозотоцину (2) та інсуліну з ІПК (3); * $P < 0,05$ порівняно з контролем (1); ** $P < 0,05$ порівняно з плацебо-контролем (2)

показників ліпідного обміну (див. рис. 2, в). Застосування інсуліну з ІПК сприяло збільшенню порівняно зі змінами у підгрупі плацебо-контролю вмісту ЛПВЩ (у 1,2 раза; $P < 0,05$) при зменшенні вмісту ЛПНЩ, тригліцеридів і ЛПДНЩ (у 1,2-1,5 раза; $P < 0,05$).

Таким чином, при моделюванні ЦД1 основні зміни були такими: збільшення вмісту холестерину, тригліцеридів і ЛПДНЩ, що могло бути наслідком активації ліполізу. У тварин на жировій дієти спостерігався приріст усіх показників жирового обміну, а введення стрептозотоцину супроводжувалося подальшим накопиченням у крові ЛПВЩ і ЛПНЩ. На тлі лікування з використанням інсуліну і ІПК при ЦД1 збільшувався лише вміст ЛПВЩ, що відмічено також і при жирових моделях ЦД2. Натомість останні характеризувалися і зменшенням вмісту тригліцеридів і ЛПДНЩ, що могло бути пов'язано із зниженням активності ліполізу за умов меншої глікемії.

Відомо, що у пацієнтів з інсулінорезистентністю на тлі аліментарно-конституціонального ожиріння порушуються центральні механізми регуляції апетиту, внаслідок чого збільшується потяг до солодкого [3]. Для перевірки припущення про негативну роль глюкозного навантаження на тлі жирової дієти в окремій підгрупі 3-ї групи проведено аналіз показників жирового обміну у тварин, що перебували на жировій дієти, а також з додатковим додаванням до корму 10%-ї глюкози, починаючи зі 120-ї доби експерименту (табл. 1).

Як і можна було очікувати, через 120 діб було відмічено достеменно збільшення порівняно з контрольною групою всіх показників жирового обміну з максимальним приростом вмісту холестерину, ЛПНЩ, тригліцеридів і ЛПДНЩ. Через 150 діб їх вміст лишався стабільним, а через 180 діб достеменно збільшувався тільки вміст холестерину. Отже, якщо гіперглікемія було відмічена через 150 діб

Таблиця 1. Динаміка показників жирового обміну у тварин, що перебували на жировій дієті без та з додаванням глюкози ($M \pm m$)

Показник	Контроль	Жирова дієта				
		120 діб	150 діб	150 діб і додавання глюкози	180 діб	180 діб і додавання глюкози
Холестерин, ммоль/л	1,30±0,12	2,00±0,18*	2,10±0,15*	2,59±0,22*.*	2,48±0,25*.*.*	2,58±0,23*
Ліпопротеїди, ммоль/л						
високої щільності	0,91±0,05	1,14±0,09*	1,22±0,11*	1,32±0,15*	1,30±0,17*	1,35±0,12*
низької щільності	0,25±0,01	0,42±0,03*	0,40±0,02*	0,47±0,05*	0,43±0,04*	0,44±0,3*
дуже низької щільності	0,22±0,01	0,42±0,03*	0,44±0,02*	0,47±0,05*	0,46±0,04*	0,48±0,04*
Тригліцериди, ммоль/л	0,68±0,04	0,88±0,07*	0,79±0,06*	0,79±0,07*	0,78±0,06*	0,83±0,07*
Глюкоза, ммоль/л	5,65±0,37	6,25±0,59	6,43±0,64*	6,41±0,52*	7,60±0,57*.*.*	7,73±0,49*.*.*

* $P < 0,05$ порівняно з контролем; ** $P < 0,05$ порівняно з підгрупою без додавання глюкози; *** $P < 0,05$ порівняно з попереднім терміном.

(див. табл. 1), то зсув жирового обміну чітко визначався раніше – на 120-ту добу.

Додавання до раціону глюкози сприяло збільшенню вмісту холестерину вже через 150 діб, тобто раніше, ніж у основній групі. За іншими показниками різниці відмічено не було. Це певною мірою свідчило про атерогенний ефект додаткового навантаження глюкозою за умов тривалої жирової дієти.

Таким чином, динаміка порушень ліпідного обміну у щурів з жировою дієтою характеризувалася стабільним накопиченням у крові холестерину та його фракцій, а також тригліцеридів. Додавання до дієти глюкози сприяло більшому вмісту в крові холестерину, тоді як істотно на глікемію через 150 і 180 діб не впливало (див. табл. 1). У (3-тя та 4-та групи) тварин з жировою дієтою та введенням стрептозотоцину біохімічно були визначені показники білкового обміну, обміну речовин

та функції печінки (табл. 2). На тлі жирової дієти відмічено достеменно гіпопротеїнемію, що було особливо виражено при введенні стрептозотоцину: вміст у крові загального білка знижувався порівняно з контролем на 9,4 і 11,2% відповідно ($P < 0,05$). Введення ІПК істотно не впливало на цей показник.

Значно зменшився вміст у крові сечовини порівняно з контролем, що було більше виражено при введенні стрептозотоцину – на 19,6 і 27,7% відповідно ($P < 0,05$). Застосування ІПК знижувало його порівняно зі значеннями у тварин без лікування – на 8,3 і 10,9% відповідно ($P < 0,05$). Також жирова дієта викликала зменшення у крові вмісту креатиніну (на 33,3–36,8%; $P < 0,05$), на що введення ІПК не впливало. Активність трансаміназ у крові збільшувалася: АлАТ у 1,8-1,9 раза і АсАТ у 1,16–1,3 раза ($P < 0,05$), що не залежало від застосування ІПК.

Таблиця 2. Показники обміну речовин та функції печінки у групах тварин з жировою дієтою ($M \pm m$)

Показник	Контроль	Жирова дієта			
		Без лікування	Інгібітори протеїнказ (ІПК)	Стрептозотоцин	Стрептозотоцин, інсулін і ІПК
Білок, г/л	70,8±0,58	64,17±0,51*	64,7±0,48*	62,9±0,38*	61,6±0,44*
Альбумін, г/л	40,3±0,31	42,0±0,27*	41,1±0,30	41,6±0,18	40,4±0,21
Сечовина, ммоль/л	7,50±0,17	6,03±0,09*	5,53±0,16**	5,42±0,11*	4,83±0,07**
Креатинін, ммоль/л	58,5±1,43	37,0±1,44*	39,0±1,17*	38,2±1,22*	37,3±1,08*
Аланінаміно-трансфераза, Од/л	64,5±3,45	117,3±6,51*	121,7±7,56*	115,7±5,29*	124,6±6,3*
Аспартатаміно-трансфераза, Од/л	88,5±5,2	112,0±6,85*	115,7±6,92*	107,2±7,01*	102,3±6,51*
Білірубін, мкмоль/л					
загальний	2,11±0,15	1,60±0,12*	2,23±0,15	1,85±0,14*	1,83±0,11*
прямий	0,72±0,06	0,73±0,05	0,8±0,04*	0,83±0,03*	0,67±0,05**
непрямий	1,38±0,25	0,87±0,18*	1,33±0,30**	1,07±0,16	1,17±0,19

* $P < 0,05$ порівняно з контролем; ** $P < 0,05$ порівняно з підгрупами без лікування ІПК.

На тлі жирової дієти відмічено незначне, але достовірне зменшення у крові вмісту загального білірубину, що у 3-й групі відбувалося переважно за рахунок непрямого білірубину, а у 4-й групі – прямого. Застосування ІПК у 3-й групі вміст загального і непрямого білірубину відновлювало, тоді як у 4-й групі вміст прямого білірубину й надалі знижувався (див. табл. 2).

Таким чином, тривала жирова дієта призводила до розвитку гіпопротеїнемії, зменшення вмісту у крові сечовини, креатиніну і непрямого білірубину, збільшення активності трансаміназ, особливо АЛАТ. Це могло свідчити про активацію протеолізу та тлі недостатності білоксинтезуючої функції печінки внаслідок, імовірно, формування жирового гепатозу, а також метаболічного ацидозу [20, 21]. Введення стрептозоточину сприяло гіпопротеїнемії та зменшенню вмісту сечовини при підвищенні загального та прямого білірубину, що могло спричиняти погіршення метаболізму та печінкових функцій. Введення ІПК в обох групах суттєвого впливу на вивчені показники не мало, крім істотного зменшення вмісту сечовини, а також відновлення вмісту непрямого білірубину у 3-й групі та прямого білірубину у 4-й.

У багатьох працях, особливо останніх років, стверджується, що стрептозоточин через системний токсичний вплив, ендотеліальну дисфункцію, залучення внутрішньоклітинних сигнальних каскадів та інші механізми може викликати стан інсулінорезистентності, що особливо проявляється за умов високожирової дієти та вуглеводного навантаження [4–7]. Слід зазначити, що стан інсулінорезистентності діагностується, виходячи з високого вмісту у крові як глюкози, так і інсуліну – збільшення індексу НОМА-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) [3]. Водночас стрептозоточиніндуковані моделі діабету при збільшенні вмісту глюкози характеризуються гіпоінсулінемією внаслідок загибелі β -клітин [6]. Відтермінованість гіпоглікемічної реакції на введення екзогенного

інсуліну вважається проявом інсулінорезистентності [7, 17], що, враховуючи дефіцит інсуліну, є спірним висновком. Встановлений нами розвиток вираженої гіперліпідемії, гіпопротеїнемії, гіперферментемії вказували на можливу роль печінкової недостатності і механізмів відновлення вмісту глюкози в крові. Безумовно, потрібні подальші дослідження для об'єктивного визначення стану інсулінорезистентності, наприклад, з використанням гіперінсуліно-еуглікемічного тесту [22] при одночасному аналізі стану обміну речовин та функції печінки.

Натомість жирова дієта і без введення стрептозоточину може викликати інсулінорезистентність, що підтверджено зниженням швидкості розвитку гіпоглікемії в тесті толерантності до глюкози з введенням екзогенного інсуліну, збільшенням вмісту у крові інсуліну й індексу НОМА-IR [23, 24]. На думку авторів, як і на нашу, застосування стрептозоточину у щурів, яких годували жиром, імітує природне прогресування захворювання з формуванням абсолютної інсулінової недостатності при тривалому перебігу ЦД2.

Жирова дієта показала чіткий зв'язок з ожирінням, маса тіла тварин значно збільшувалася, що відмічено й іншими авторами [4] і добре узгоджувалося з накопиченням у крові холестерину і ліпопротеїдів. Введення стрептозоточину зупинило приріст маси тіла.

Смертність після ін'єкції діабетогенних доз стрептозоточину зумовлена тяжкою гіпоглікемією (протягом перших 24 год) або тяжкою гіперглікемією (через 24 год після ін'єкції та пізніше) [6]. Навіть за умов стандартного введення цієї речовини у щурів реєструється спектр порушень вуглеводного обміну – від повної відсутності реакції до розвитку гіперглікемічної коми. У наших дослідження також спостерігалася певна дисперсія відповіді на стрептозоточин. Факт різкого збільшення летальності та тлі тривалої жирової дієти, навіть незважаючи на двократне зменшення його дози, підтверджував думку про адекватність цієї моделі

для відтворення саме тяжкої прогресії ЦД2 з розвитком на тлі інсулінорезистентності абсолютної інсулінової недостатності.

Нами показана принципова можливість застосування ІПК для корекції діабетичних ускладнень, що узгоджується з іншими літературними даними. Так, доведена роль серин/треонінової протеїнкінази свавців з родини фосфатидилінозитол-3-кінази mTORC1 (mammalian target of rapamycin, complex 1) як критичного медіатора розвитку ЦД2 сприянням резистентності до інсуліну, гіперліпідемії, запалення, вазоконстрикції та стресу [8]. Блокування сигнального шляху MAPK/ERK пригнічувало окисний стрес, що зменшувало індукований протеїнуриєю піроптоз в епітеліальних клітинах ниркових каналців при діабетичній хворобі нирок [9].

Застосований нами препарат сорафеніб є мультікіназним інгібітором, який зменшує проліферацію пухлинних клітин *in vitro* через пригнічення внутрішньоклітинних сигнальних кіназ [25]. В експерименті він ефективно гальмував прогресування неалкогольного стеатогепатиту у мишей і мавп через індукцію м'якого мітохондріального роз'єднання та подальшої активації АМФ-активованої протеїнкінази [26]. Можливо такі його властивості пояснювали встановлені нами ефекти запобігання розвитку гіперглікемії за всіма моделями ЦД, зменшення маси тіла при ЦД2, вмісту тригліцеридів і ЛПДНЩ при збільшенні ЛПВЩ.

Таким чином, проведене дослідження підтвердило відомі особливості перебігу стрептозототиніндукованого діабету у щурів на стандартному раціоні та жировій дієті та показало, що за умов тривалого її застосування розвиваються значні порушення вуглеводного, білкового та жирового обміну. Застосування ІПК може бути перспективним напрямком корекції діабетичних ускладнень, оскільки ефективно знижувало гіперглікемію, попереджало зростання маси тіла та порушення ліпідного обміну.

ВИСНОВКИ

1. Незалежно від типу дієти введення стрептозототину призводило до розвитку вираженої гіперглікемії, втрати маси тіла, глюкозурії і кетонурії, поліурії і полідипсії, що свідчило про пошкодження β-клітин і абсолютну інсулінову недостатність. Значно гіршими клінічні прояви були у тварин, які перебували на жировій дієті, що супроводжувалося високою летальністю (53,3% щодо 12% при моделюванні ЦД1). Висококалорійна жирова дієта сприяла розвитку незначної гіперглікемії тільки на 150-ту добу її застосування, додаткове навантаження глюкозою суттєво не впливало на стан вуглеводного обміну.

2. При моделюванні ЦД1 порушення ліпідного обміну проявлялися збільшенням вмісту холестерину, тригліцеридів і ЛПДНЩ, що могло бути наслідком активації ліполізу. Жирова дієта закономірно супроводжувалася гіперхолестерин- і гіперліпідемією, що відмічено на 120-ту добу, тобто раніше, ніж розвивалася гіперглікемія. Додавання до жирової дієти глюкози мало атерогенний ефект, оскільки збільшувало вміст у крові холестерину.

3. Тривала жирова дієта сприяла пригніченню білкового обміну, що проявлялося гіпопротеїнемією, зменшенням вмісту у крові сечовини, креатиніну і непрямого білірубину. Збільшення активності трансаміназ, особливо АЛАТ, підтверджувало пошкодження гепатоцитів у вигляді стеатогепатозу.

4. Встановлені прояви розвитку ЦД1 і ЦД2 значною мірою відновлювалися під впливом введення ІПК: зменшувалися рівень глікемії і втрата маси тіла, вміст тригліцеридів і ЛПДНЩ, збільшувався вміст ЛПВЩ і нормалізувався пігментний обмін.

Автори дякують завідувачу віварію Національного медичного університету імені О.О. Богомольця Довгань В.С. за допомогу в організації експериментів та док.мед.наук Гнілорібову А.М. за сприяння проведенню біохімічних досліджень.

Дослідження виконано за ініціативи кафедри патофізіології НМУ імені О.О. Богомольця (Київ, Україна) та фінансується за бюджетною програмою МОЗ України, державний реєстраційний номер 0122U001308.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

S.V. Ziablitzev¹, K.O. Usenko¹, O.V. Dobrovinska², Yu.V. Pereplytsa¹, V.A. Andrushchenko¹

THE METABOLIC EFFECT OF CELLULAR PROTEIN KINASES BLOCKADE ON THE EXPERIMENTAL DIABETES

¹*Bogomoletz National Medical University, Kyiv;*

²*V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, Kyiv; e-mail: zsv1965@gmail.com*

Prospective use of receptor protein kinase inhibitors (PKI) for the prevention and/or treatment of diabetic complications necessitates the study of their effect on carbohydrate, lipid, and protein metabolism in experimental models of type 1 (DM1) and type 2 (DM2) diabetes. DM1 was modeled in male Wistar rats with streptozotocin administration (50 mg/kg), DM2 – by long-term (180 days) maintenance on a high-calorie fat diet (HFD; 56,7% fat) with the introduction of a lower dose of streptozotocin (25 mg/kg). For the treatment, we used insulin (“Actrapid Novo Nordisk”, Denmark) and a PKI inhibitor Sorafenib (“Cipla”, India), added orally in sachet form (150 mg/kg). Regardless of the diet type, the streptozotocin administration led to hyperglycemia, weight loss, glucose- and ketonuria, polyuria, and polydipsia. The severity of these manifestations was heightened in HFD rats, with a mortality rate of 53.3% observed (when modeling DM1 – 12%), likely attributed to the onset of liver failure. In HFD rats, slight hyperglycemia was noted only on the 150th day. All the diabetes models used were accompanied by significant hypercholesterolemia and hyperlipidemia. The addition of glucose to HFD rats increased the cholesterol content. HFD caused hypoproteinemia, metabolism suppression and increased transaminases activity. The established violations were largely restored with the use of PKI: glycemia level, body weight loss, the content of triglycerides and very low-density lipoproteins decreased; an increase in high-density lipoproteins and the normalization of pigment metabolism were observed. Key words: hyperglycemia; fat diet; streptozotocin; steatohepatosis; hypoproteinemia; hypercholesterolemia; hypertriglyceridemia.

REFERENCES

1. Patterson CC, Karuranga S, Salpea P, Saeedi P, Dahlquist G, Soltesz G, Ogle GD. Worldwide estimates of incidence, prevalence and mortality of type 1 diabetes in children and adolescents: Results from the international diabetes federation diabetes atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019 Nov;157:107842.
2. Lovic D, Piperidou A, Zografou I, Grassos H, Pittaras A, Manolis A. The growing epidemic of diabetes mellitus. *Curr Vascul Pharmacol.* 2020;18(2):104-9.
3. Valaiyapathi B, Gower B, Ashraf AP. Pathophysiology of type 2 diabetes in children and adolescents. *Curr Diabet Rev.* 2020;16(3):220-9.
4. Gheibi S, Kashfi K, Ghasemi A. A practical guide for induction of type-2 diabetes in rat: Incorporating a high-fat diet and streptozotocin. *Biomed Pharmacother.* 2017 Nov;95:605-13.
5. Goyal SN, Reddy NM, Patil KR, Nakhate KT, Ojha S, Patil CR, Agrawal YO. Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes - A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. *Chem Biol Interact.* 2016 Jan 25;244:49-63.
6. Ghasemi A, Jeddi S. Streptozotocin as a tool for induction of rat models of diabetes: A practical guide. *EXCLI J.* 2023 Feb 21;22:274-94.
7. Sharma M, Chan HK, Lavilla CA Jr, Uy MM, Froemming GRA, Okechukwu PN. Induction of a single dose of streptozotocin (50 mg) in rat model causes insulin resistance with type 2 diabetes mellitus. *Fundam Clin Pharmacol.* 2023 Aug;37(4):769-78.
8. Saha S, Fang X, Green CD, Das A. mTORC1 and SGLT2 Inhibitors-a therapeutic perspective for diabetic cardiomyopathy. *Int J Mol Sci.* 2023 Oct 11;24(20):15078.
9. Zhang K, Li M, Yin K, Wang M, Dong Q, Miao Z, Guan Y, Wu Q, Zhou Y. Hyperoside mediates protection from diabetes kidney disease by regulating ROS-ERK signaling pathway and pyroptosis. *Phytother Res.* 2023 Dec;37(12):5871-82.
10. Mehrabadi ME, Salemi Z, Babaie S, Panahi M. Effect of biochanin a on retina levels of vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Can J Diabet.* 2018 Dec;42(6):639-44.
11. Ziablitzev SV, Vodianyuk VV, Dyadyk OO. The influence of tyrosine protein kinases blockade on the vasculonodular growth factor expression and diabetic retinopathy development. *Fiziol Zh.* 2023; 69(5): 22-32. [Ukrainian].
12. Ziablitzev SV, Vodianyuk VV. Retinal apoptosis and the effect of tyrosine kinase inhibition in experimental diabetes. *J Ophthalmol.* 2023;5(514):34-40. [Ukraine].
13. Vodianyuk VV, Ziablitzev SV, Andrushchenko VI. Effect of tyrosine protein kinase blockade on the state of retinal microglia in diabetic retinopathy. *Int J Endocrinol.* 2023;19(5):337-43. [Ukrainian].
14. Wu C, Xu K, Liu W, Liu A, Liang H, Li Q, Feng Z, Yang

- Y, Ding J, Zhang T, Liu Y, Liu X, Zuo Z. Protective effect of Raf-1 kinase inhibitory protein on diabetic retinal neurodegeneration through P38-MAPK pathway. *Curr Eye Res.* 2022 Jan;47(1):135-42.
15. Striglia E, Caccioppo A, Castellino N, Reibaldi M, Porta M. Emerging drugs for the treatment of diabetic retinopathy. *Expert Opin Emerg Drug.* 2020 Sep;25(3):261-71.
16. Boneva SK, Wolf J, Hajdú RI, Prinz G, Salié H, Schlecht A, et al. In-depth molecular characterization of neovascular membranes suggests a role for hyalocyte-to-myofibroblast transdifferentiation in proliferative diabetic retinopathy. *Front Immunol.* 2021 Nov 2;12:757607.
17. Natrus LV, Osadchuk YuS, Labudzynski DO, Chaikovskiy YuB, Smirnov AS. The pathogenetic rationale the ways of experimental type 2 diabetes mellitus modeling. *Med Sci Ukraine.* 2019;3-4(15):10-18. [Ukrainian].
18. Oraby MA, El-Yamany MF, Safar MM, Assaf N, Ghoneim HA. Dapagliflozin attenuates early markers of diabetic nephropathy in fructose-streptozotocin-induced diabetes in rats. *Biomed Pharmacother.* 2019 Jan;109:910-20.
19. Calorie table online, 2024 (Dine4FIT, Inc., Czech Republic) [Internet]. Available from://www.tablycjakalorijnosti.com.ua.
20. Godik OS, Levytskii AF, Diehtiarova DS, Benzar IM, Korsak AV, Likhodiievskiy VV. Partial hepatic portal vein ligation: morphological assessment of prehepatic portal hypertension modeling. *Pediatr Surg.* 2023;1(78):59-65. [Ukraine].
21. Perepelytsia YuV, Mikhnev VA, Krishtal MV, Trofimova IM. Influence of non-gaseous acidosis and alkalosis on the unlimited proteolysis of blood and tissues. *Endokrynologia.* 2021;26(1):42-8. [Ukrainian].
22. Ayala JE, Bracy DP, Malabanan C, James FD, Ansari T, Fueger PT, McGuinness OP, Wasserman DH. Hyperinsulinemic-euglycemic clamps in conscious, unrestrained mice. *J Vis Exp.* 2011 Nov 16;(57):3188.
23. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res.* 2005 Oct;52(4):313-20.
24. Flanagan AM, Brown JL, Santiago CA, Aad PY, Spicer LJ, Spicer MT. High-fat diets promote insulin resistance through cytokine gene expression in growing female rats. *J Nutr Biochem.* 2008;8(19):505-13.
25. Abdelgalil AA, Alkahtani HM, Al-Jenoobi FI. Sorafenib. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol.* 2019;44:239-66.
26. Jian C, Fu J, Cheng X, Shen LJ, Ji YX, Wang X, Pan S, Tian H, et al. Low-dose sorafenib acts as a mitochondrial uncoupler and ameliorates nonalcoholic steatohepatitis. *Cell Metab.* 2020 May 5;31(5):892-908.e11.

*Матеріал надійшов
до редакції 28.03.2024*