

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ДОСЛІДЖЕННЯ СПЕЦИФІЧНОЇ АНТИДІАБЕТИЧНОЇ ДІЇ ПЕРСПЕКТИВНОГО АКТИВАТОРА СІРТУЇНУ-1 ПІРАБЕНТИНУ НА МОДЕЛІ МЕТАБОЛІЧНОЇ ПАМ'ЯТІ У ЩУРІВ*

Красова Н. С., Гладких О. І., Яременко Ф. Г., Лещенко Ж. А.,

Коваленко А. О., Громаковська О. Б., Ліпсон В. В., Полтораєв В. В.

*ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України»,
м. Харків, Україна
nkrasova@ukr.net*

За останніми даними Міжнародної Діабетичної Федерації на тепер більше 463 млн дорослих осіб у всьому світі мають діагноз цукрового діабету (ЦД), переважаючи частина яких (близько 90 % від діабетичного загалу) складає ЦД 2 типу [1]. Зростання розповсюдженості ЦД 2 типу та асоційовані з ним специфічні діабетичні ускладнення і підвищена частота кардіоваскулярної патології та смертності зумовлюють нагальну необхідність комплексної превентивної та/або патогенетично обґрунтованої реабілітаційної терапії на різних етапах розвитку хвороби.

В останнє десятиріччя увагу дослідників зосереджено на вивченні епігенетичних механізмів регуляції експресії генів як чинників канцерогенезу та вікових хронічних метаболічних порушень, зокрема ЦД 2 типу, кардіоваскулярних та нейродеге-

неративних захворювань [2]. Епігенетичні чинники впливають на функціональну активність генів без втручання у первинну структуру ДНК, що їх формує. Так, введення ацетильних груп до структури гістонових білків за участю ацетилтрансфераз зменшує щільність упаковки хроматину і відкриває доступ до певних генів факторам транскрипції та полімеразам. І навпаки, сіртуїни — родина НАД⁺-залежних білків, яким притаманна деацетилазна активність, деацетилюють залишки лізину у гістонових білках з переносом ацетилю на фрагмент АДФ-рибози з НАД⁺ і тим самим сприяють конденсації хроматину і припиненню експресії генів, продукти яких у даний момент клітинам непотрібні або навіть можуть виявитися шкідливими [3]. Мішенями сіртуїнів також є транскрипційні фактори, корегулятори та метаболічні

* Роботу виконано в межах фундаментальної НДР ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України» «Дослідити вплив модюляторів активності сіртуїну-1 на детермінуючі ланки патогенезу цукрового діабету 2 типу включно з гіперглікемічною (метаболічною) пам'яттю» (№ держреєстрації 0119U002136).

Установою, що фінансує дослідження, є НАМН України.

Автори гарантують колективну відповідальність за все, що опубліковано в статті.

Автори гарантують відсутність конфлікту інтересів та власної фінансової зацікавленості.

Рукопис надійшов до редакції 7.04.2021.

ферменти, які адаптують експресію генів і метаболічну активність у відповідь на енергетичний статус клітини [3, 4]. Останнє забезпечується за рахунок залучення НАД⁺ в якості кофактору для деацетилювання, що є унікальною рисою сіртуїнів і не тільки надає шлях для об'єднання ферментативної активності з метаболічним (енергетичним) статусом клітини, але і створює можливість для зовнішньої регуляції [4]. Фармакологічна активація сіртуїну-1 (SIRT1), яка здатна імітувати обмеження калоражу,

знижувати відкладення жирів поряд зі стимуляцією їх утилізації, та, можливо, стирати «метаболічну пам'ять», таким чином, являє собою перспективну ціль для профілактики і терапії ожиріння та ЦД 2 типу.

Метою роботи було оцінити специфічну антидіабетичну дію оригінальної гетероциклічної сполуки з умовною назвою пірабентін з доведеною *in situ* здатністю активувати сіртуїн-1 людини на експериментальній моделі «метаболічної пам'яті» у щурів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Антидіабетичні властивості пірабентіну [5] за довготривалого введення (60 днів) вивчали на експериментальній моделі «метаболічної пам'яті» з доведеними розробниками молекулярно-біологічними характеристиками відповідних процесів на рівні роботи геному, яка відтворює ожиріння та інсулінорезистентність [6]. Молодих статевозрілих самців щурів популяції Вістар ($n = 24$) протягом п'яти місяців утримували на високожировому раціоні харчування (ВЖР, білки — 20,0 %, жири — 60,0 %, вуглеводи — 20,0 % від загального калоражу) з вільним доступом до води, з природною зміною режиму освітлення, температура та вологість повітря – за стандартами виварію. Контрольна група тварин ($n = 6$) відповідної статі та віку отримувала стандартний раціон (СтР, білки — 15,0 %, жири — 5,0 %, вуглеводи – 80,0 % від загального калоражу) за аналогічних умов [7]. Після завершення 5-місячного періоду ВЖР тварин рандомізували для дослідження протягом наступних двох місяців на 4 групи таким чином:

- група, що продовжила отримувати ВЖР та одержувала плацебо (3–5 % водну емульсію Твіну-80) перорально (ВЖР/ВЖР + плацебо);
- група, яка отримувала СтР та плацебо (ВЖР/СтР + плацебо);
- група, яка отримувала СтР та пірабентін перорально в дозі 50 мг/кг за допомогою зонду у вигляді водної суспензії з Твіном-80 щоденно протягом двох місяців на тлі продовження ВЖР (ВЖР/СтР + ПБ);

- група, яка отримувала СтР та препарат порівняння метформін в дозі 100 мг/кг маси тіла у 3–5 % водній емульсії Твіну-80 (ВЖР/СтР + МФ).

Стан глюкозного гомеостазу та чутливості до інсуліну оцінювали у динаміці за показниками глікемії під час проведення внутрішньочеревного тесту толерантності до глюкози (ВЧТТГ) (3 г/кг маси тіла, 0 хв; 30 хв; 60 хв та 120 хв) та короткого інсулінового тесту (кІТ, 1 Од/кг маси тіла, 0 хв; 15 хв, 30 хв та 60 хв) після 6-годинного голодування за допомогою глюкозооксидазного методу з використанням прибору Eksan-Gm (Литва) [8, 9].

Розраховували показник інтегральної глікемії (ІГ) при проведенні тестів. Визначали артеріальний тиск за допомогою апарату для неінвазивного вимірювання кров'яного тиску LE5002 (Panlab, Harvard Apparatus, Іспанія). Після знеживлення тварин шляхом транслокації шийних хребців визначали масу фракцій жирової тканини (епідидимальний, мезентеріальний, ретроперитонеальний та загальний абдомінальний жир). Дослідження проводили згідно з національними «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах», що узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» [10]. Отриманий цифровий матеріал проаналізували із застосуванням тесту Шапіро–Уїлка, парного та непарного *t*-критерію Стьюдента і *U*-критерію Манна–Уїтні [11, 12].

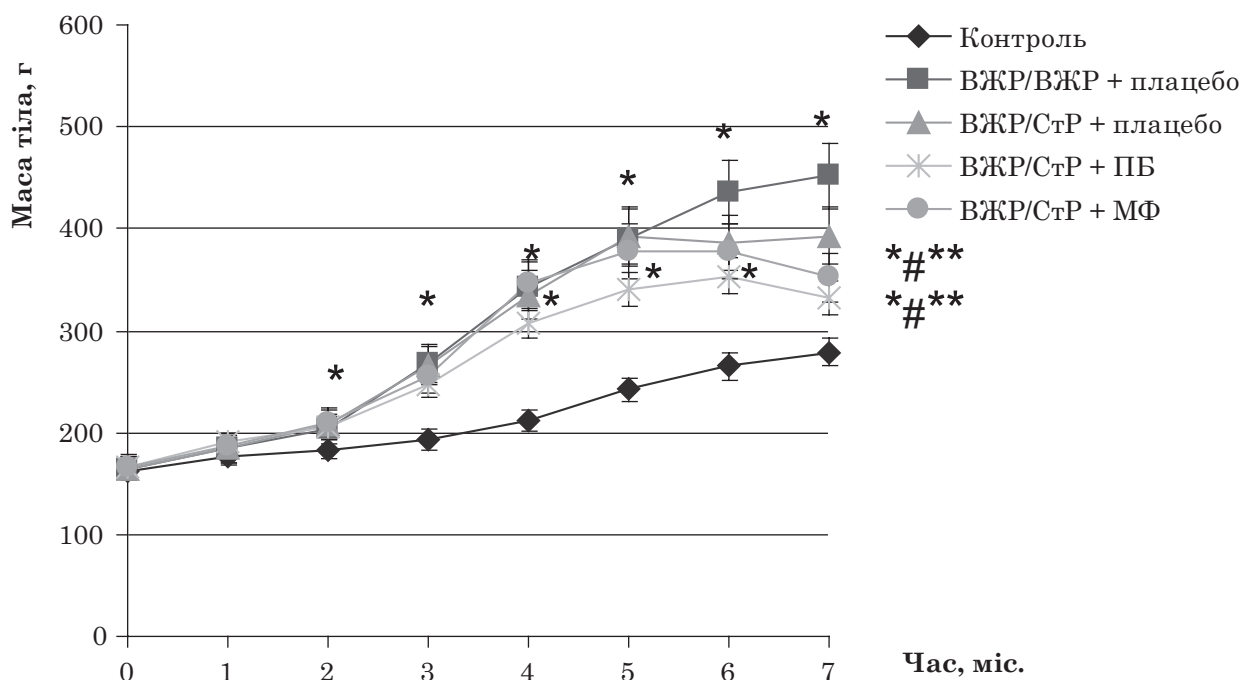


Рис. 1. Динаміка маси тіла щурів протягом експерименту, г, n = 5, ($\bar{X} \pm S_x$).

* P < 0,001 відносно групи «Контроль»;

P < 0,001 відносно групи «ВЖР/СТР + плацебо»;

** P < 0,001 відносно групи «ВЖР/ВЖР + плацебо».

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В результаті проведеного дослідження встановлено, що в усіх групах щурів, які були піддані моделюванню «метаболічної пам'яті», відзначалося істотне підвищення маси тіла відносно контрольних тварин (рис. 1), починаючи з 2-го місяця експерименту.

Довготривале введення перспективної сполуки-активатора SIRT1 пірабентіну або препарату порівняння метформіну призвело до меншого зростання маси тіла тварин, ніж в групах, які отримували плацебо (див. рис. 1). Було проведено оцінку маси фракцій абдомінальної жирової тканини у тварин за використаної моделі та виявлено, що пірабентін та препарат порівняння знижували обсяг абдомінальної жирової тканини по всім фракціям, але її загальний вміст залишився вищим, ніж у контрольних тварин (табл. 1).

У тварин також спостерігалось поступове невелике, але статистично значуще зростання протягом формування моделі базальної глікемії відносно контрольної групи, яка залишалася збільшеною навіть після переведення тварин на стандарт-

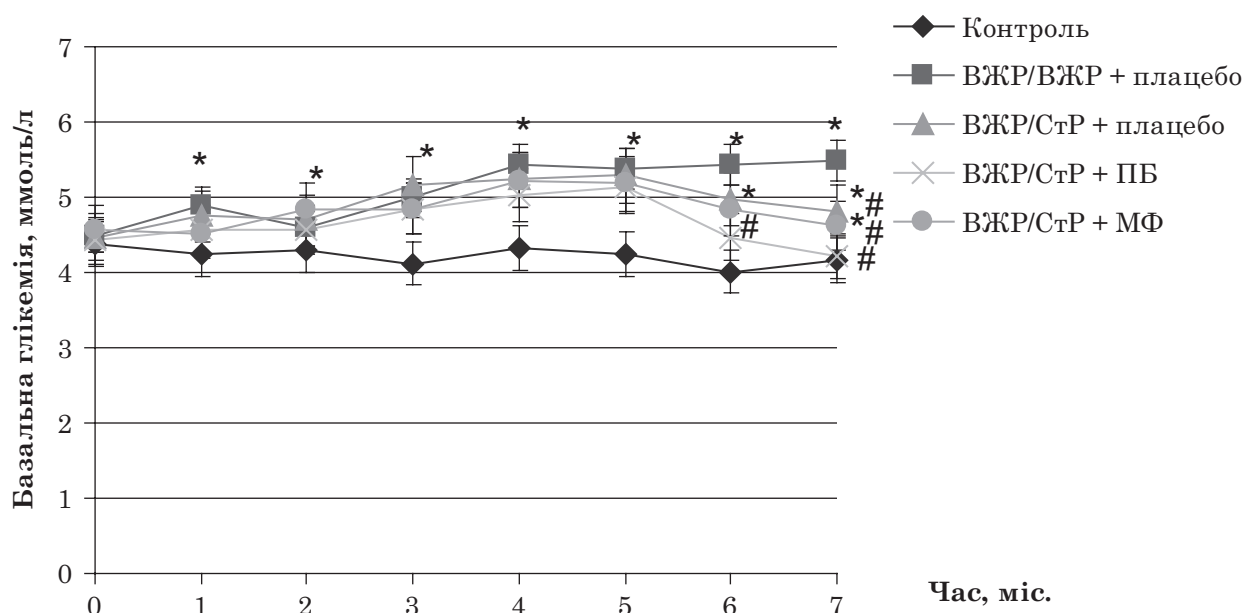
не харчування (рис. 2). 60-денне введення пірабентіну або препарату порівняння нормалізувало базальну глікемію у щурів. Слід відзначити, що дія пірабентіну, на відміну від метформіну, проявлялася зі статистичною значущістю вже через 1 місяць введення (див. рис. 2).

Обрана модель викликала розвиток інтолерантності до глюкози та зменшену реакцію на введення екзогенного інсуліну у експериментальних тварин (рис. 3). Активні сполуки помітно впливали на вищевказані параметри, про що свідчили показники глікемії на всіх часових проміжках проведення тестів (не наведено) та значення їх ІГ (див. рис. 3). Слід відмітити, що відсоток зниження рівнів глюкози на 15 хв. кІТ у тварин, які отримували метформін, був значуще вищим, ніж у групі пірабентіну ($33,87 \pm 0,69$ % проти $23,87 \pm 3,37$ % відповідно, P < 0,02). Це доводить більший вплив препарату порівняння на першу фазу інсулінової відповіді у щурів з інсулінорезистентністю. З іншого боку, показник ІГ протягом кІТ свідчить про достатньо виразну нормалізацію вуглеводного обміну

Маса фракцій абдомінальної жирової тканини у щурів наприкінці експерименту, $n = 5$, ($\bar{X} \pm S_x$)

Група	Маса жирової тканини, г			
	епідидимальна	мезентеріальна	ретроперитонеальна	загальна абдомінальна
Контроль	4,35 ± 0,52	3,45 ± 0,44	5,13 ± 0,35	12,93 ± 1,26
ВЖР/ВЖР + плацебо	10,13 ± 1,03 $P_1 < 0,001$	9,19 ± 0,95 $P_1 < 0,001$	11,62 ± 0,93 $P_1 < 0,001$	30,94 ± 2,50 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,002$
ВЖР/СтР + плацебо	8,27 ± 0,89 $P_1 < 0,001$	7,22 ± 0,52 $P_1 < 0,001$	8,48 ± 0,61 $P_1 < 0,001$	23,98 ± 1,45 $P_1 < 0,001$
ВЖР/СтР + ПФ	6,41 ± 0,58 $P_1 < 0,03$ $P_3 < 0,05$	5,47 ± 0,52 $P_1 < 0,02$ $P_2 < 0,05$ $P_3 < 0,05$	6,06 ± 0,52 $P_1 < 0,02$ $P_2 < 0,02$ $P_3 < 0,05$	17,93 ± 1,09 $P_1 < 0,02$ $P_3 < 0,001$
ВЖР/СтР + МФ	6,02 ± 0,57 $P_2 < 0,01$ $P_3 < 0,05$	5,53 ± 0,25 $P_1 < 0,005$ $P_2 < 0,02$	8,18 ± 0,73 $P_1 < 0,005$	19,73 ± 1,10 $P_1 < 0,005$ $P_3 < 0,001$

Примітки.

 P_1 — значущість змін відносно групи «Контроль»; P_2 — значущість змін відносно групи «ВЖР/СтР + плацебо»; P_3 — значущість змін відносно групи «ВЖР/ВЖР + плацебо».Рис. 2. Динаміка базальної глікемії у щурів протягом експерименту, ммоль/л, $n = 5$, ($\bar{X} \pm S_x$).* $P < 0,01$ відносно групи «Контроль»;# $P < 0,05$ відносно групи «ВЖР/ВЖР + плацебо».

у досліджуваних тварин після 60-денного вживання як перспективного активатора SIRT1, так і препарату порівняння (див. рис. 3).

Відтворена модель призводила до статистично значущого ($P < 0,001$) підвищення як систолічного, так і діастолічного арте-

ріального тиску у піддослідних тварин. Після 60-денного введення активних сполук показники артеріального тиску зазнали статистично значущого відновлення в порівнянні до груп, які отримували плацебо, але відносно контрольних тварин зазначені параметри залишилися підви-

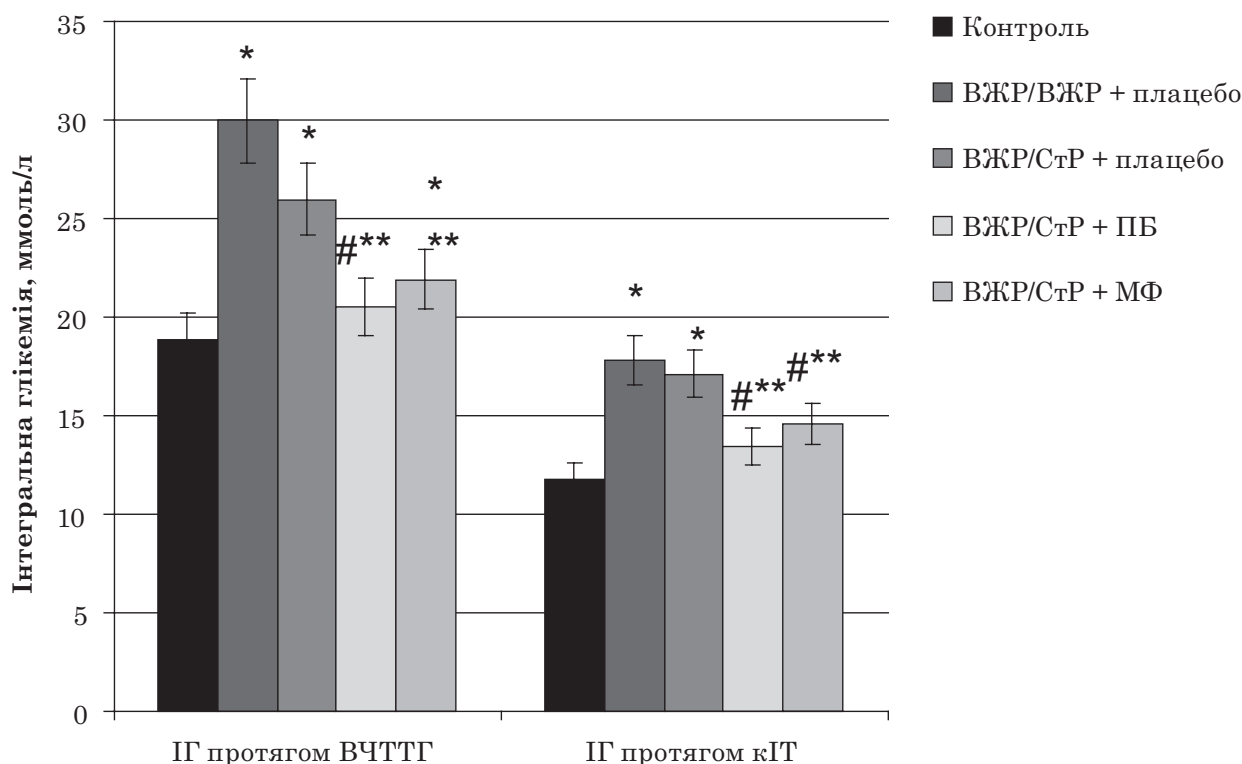


Рис. 3. Інтегральна глікемія протягом ВЧТТГ та кІТ у щурів наприкінці експерименту, ммоль/л, n=5, ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$).

* P < 0,01 відносно групи «Контроль»;

P < 0,001 відносно групи «ВЖР/СТР + плацебо»;

** P < 0,001 відносно групи «ВЖР/ВЖР + плацебо».

щеними. Це може бути пов'язано з необхідністю більш тривалого терапевтичного впливу на патологічний процес, який розвивався протягом 5 місяців [6].

Таким чином, доведена наявність у пірабентіну комплексних антидіабетичних властивостей відносно нормалізації вуглеводного обміну і зниження проявів інсулінорезистентності та абдомінального ожиріння поряд з поліпшенням кров'яного

тиску у щурів на моделі «метаболічної пам'яті» на рівні референтного лікарського засобу метформіну. Отримані результати дозволяють припустити здатність пірабентіну впливати на прояви «метаболічної пам'яті», однак необхідні подальші дослідження для підтвердження присутності цих механізмів як складових терапевтичного впливу сполуки.

ВИСНОВКИ

1. На експериментальній моделі «метаболічної пам'яті» у щурів, викликаній тривалим високожировим раціоном харчування, верифіковано комплексні антидіабетичні властивості перспективного активатора сіртуїну-1 під умовною назвою пірабентін після 60-денного перорального використання.
2. Сполука продемонструвала здатність впливати на прояви інсулінорезистентності, поліпшувала артеріальний тиск та знижувала масу абдомінального жиру, не поступаючи дії препарату порівняння метформіну.

**ЛІТЕРАТУРА
(REFERENCES)**

1. International Diabetes Federation. Diabetes Atlas. 9th Ed, Brussels, 2019: 150 p.
2. Voss TC, Hager GL. *Nat Rev Genet* 2014; 15: 69-81.
3. Ramkumar R, Richa G, Marija KD, Constantinos D. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 1-17.
4. Zhao L, Cao J, Hu K, et al. *Aging and Disease* 2020; 11(4): 927-945.
5. Patent 121946 UA. 5-[2-(1,3-Dymetyl-1H-pirazol-4-il)-2,3-dygidro-1H-1,5-benzodiazepin-4-il]-4-gidroksy-2H-1,3-tiazyn-2,6(3H)-dion, shho vyjavljaje kompleksnu antydiabetychnu aktyvnist' na tli ozhyrinnja, ta sposib jogo oderzhanja (varianty).
6. Tikoo K, Sharma E, Rao Amara V, et al. *J Biol Chem* 2016; 291(42): 21848-21856.
7. Zapadnjuk IP, Zapadnjuk VI, Zaharija EA, et al. *Laboratornye zhivotnye, Kiev*, 1983: 383 p.
8. Poltorak VV, Gorbenko NI. *Metodychni rekomendacii z eksperymental'nogo vyvchennja novyh gipoglikemichnyh zasobiv. Doklinichni doslidzhennja likars'kyh zasobiv; za red. Stefanova OV, Kyev*, 2001: 396-408.
9. Akinmokun A, Selby P, Ramaiya K, et al. *Diabet Med* 1992; 9(5): 432-437.
10. Zagal'ni etychni pryncypy eksperimentiv na tvarynah. *Endokrynologija* 2003;8(1): 142-145.
11. Royston J. *Applied Statistic* 1992;31: 115-124.
12. Atramentova L Utjevs'ka O. *Statystychni metody v biologii' : pidruchnyk, Harkiv*, 2007: 288 p.

**ДОСЛІДЖЕННЯ СПЕЦИФІЧНОЇ АНТИДІАБЕТИЧНОЇ ДІЇ
ПЕРСПЕКТИВНОГО АКТИВАТОРА СІРТУЇНУ-1 ПІРАБЕНТІНУ
НА МОДЕЛІ МЕТАБОЛІЧНОЇ ПАМ'ЯТІ У ЩУРІВ**

**Красова Н. С., Гладких О. І., Яременко Ф. Г., Лещенко Ж. А.,
Коваленко А. О., Громаковська О. Б., Ліпсон В. В., Полторак В. В.**

*ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України»,
м. Харків, Україна
nkrasova@ukr.net*

Фармакологічна активація сіртуїну-1 (SIRT1), яка здатна імітувати обмеження калоражу, знижувати відкладення жирів поряд зі стимуляцією їх утилізації, та, можливо, стирати «метаболічну пам'ять», являє собою перспективну ціль для профілактики і терапії ожиріння та діабету 2 типу.

Метою роботи було оцінити специфічну антидіабетичну дію оригінальної гетероциклічної сполуки з умовною назвою пірабентін з доведеною *in situ* здатністю активувати сіртуїн-1 людини на експериментальній моделі «метаболічної пам'яті» у щурів.

Дослідження проведено на статевозрілих самцях щурів Вістар (n = 24), яких протягом 5 місяців утримували на високожировому раціоні харчування (ВЖР), контрольна група тварин відповідної статі та віку (n = 6) споживала стандартний раціон (СтР). Після завершення 5-місячного періоду ВЖР тварин рандомізували для дослідження протягом наступних двох місяців на 4 групи таким чином: ВЖР/ВЖР + плацебо, ВЖР/СтР + плацебо, ВЖР/СтР + пірабентін (ПБ), ВЖР/СтР + метформін (МФ). Пірабентін вводили перорально в дозі 50 мг/кг маси тіла у вигляді водної суспензії з Твіном-80 щоденно, препарат порівняння МФ надавали за аналогічною схемою в дозі 100 мг/кг маси тіла, контрольна група отримувала плацебо. Проводили тест толерантності до глюкози та короткий інсуліновий тест, оцінювали масу тіла, масу абдомінальної жирової тканини по фракціям та кров'яний тиск. Цифровий матеріал проаналізували із застосуванням тесту Шапіро–Уїлка, парного та непарного *t*-критерію Стьюдента і *U*-критерію Манна–Уїтні.

Встановлено, що 60-денне введення пірабентіну щурам з моделлю «метаболічної пам'яті», інсулінорезистентністю та ожирінням реалізувалося у статистично значущому зниженні базальної глікемії, інтолерантності до глюкози, маси тіла та маси фракцій абдомінальної жирової тканини тварин зі співставною з препаратом порівняння ефективністю. Це супроводжувалося поліпшенням чутливості до інсуліну та артеріального тиску.

Ключові слова: інсулінорезистентність, ожиріння, активатор сіртуїну-1, метаболічна пам'ять, щури.

**STUDY OF SPECIFIC ANTIDIABETIC EFFECT
OF PERSPECTIVE SIRTUIN-1 ACTIVATOR PYRABENTIN
ON THE MODEL OF METABOLIC MEMORY IN RATS**

**Krasova N., Gladkih A., Yaremenko F., Leshchenko Zh.,
Kovalenko A., Gromakovska O., Lipson V., Poltorak V.**

*SI «V. Danilevsky Institute of Endocrine Pathology Problems of NAMS of Ukraine»,
Kharkiv, Ukraine
nkrasova@ukr.net*

Pharmacological activation of sirtuin-1 (SIRT1), which can mimic calorie restriction, reduce fat deposition along with stimulating its utilization, and possibly erase «metabolic memory», is a promising goal for the prevention and treatment of obesity and type 2 diabetes. The aim of the study was to evaluate the specific anti-diabetic effect of the original heterocyclic compound with the proprietary name pyrabentin with *in situ* proven ability to activate human sirtuin-1 on the experimental model of «metabolic memory» in rats.

The study was conducted on adult male Wistar rats (n = 24), which were kept on a high-fat diet (HFD) for 5 months, control sex- and age-matched animals (n = 6) were received standard diet (StD). At the end of the 5-mo HFD-period, the animals were randomized for the study over the next two months into 4 groups as follows: HFD/HFD + placebo, HFD/StD + placebo, HFD/StD + pyrabentin (PB), HFD/StD + metformin (MF). PB was administered orally at 50 mg/kg body weight as an aqueous suspension with Tween-80 daily, the reference drug metformin was administered in a similar way at 100 mg/kg body weight, the control group received a placebo. Glucose tolerance test and short insulin test were performed, body weight, abdominal adipose tissue weight by fraction and blood pressure were assessed. Shapiro-Wilk test, paired and unpaired Student's t-test, and Mann-Whitney U-test were used.

It was found that 60-day administration of pyrabentin to rats with a model of «metabolic memory», insulin resistance and obesity, was realized in a statistically significant decrease in basal glycemia, glucose intolerance, body weight and weight of abdominal adipose tissue fractions with comparable efficacy to the reference drug. This was accompanied by improved insulin sensitivity and blood pressure.

Key words: insulin resistance, obesity, sirtuin-1 activator, metabolic memory, rats.