

УДК 616 – 056.257-089+615.874.2+615.241.24+577.125: 57.044

А. Л. Загайко, А. І. Шкапо, Т. О. Брюханова

Національний фармацевтичний університет

ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМІВ ЛІКУВАЛЬНОГО ВПЛИВУ ГІДРОКСИЛИМОННОЇ КИСЛОТИ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ІНСУЛІНОРЕЗИСТЕНТНОСТІ У ЩУРІВ

У результаті проведених досліджень було з'ясовано, що тривале внутрішньоочеревинне введення низьких доз дексаметазону у поєднанні з висококалорійною дієтою призводить до формування синдрому інсулінорезистентності у щурів. На фоні розвитку даної патології спостерігалось розростання жирової тканини, що супроводжувалось збільшенням концентрації глюкози в крові, зростанням вмісту кортикостерону та порушенням балансу цитокінового профілю (фактора некрозу пухлини- α , резистину та адипонектину), які синтезуються адипоцитами. Було показано, що щоденне внутрішньошлункове введення гідроксylimонної кислоти протягом 3 тижнів призводить до нормалізації зазначених показників: зниження рівня глюкози та кортикостерону в сироватці крові, усунення негативних змін цитокінового профілю. Здорові тварини, які утримувались на стандартному харчовому раціоні віварію, не мали змін досліджуваних показників на фоні тривалого прийому гідроксylimонної кислоти.

Ключові слова: інсулінорезистентність; фактор некрозу пухлини- α ; резистин; адипонектин; гідроксylimонна кислота

ВСТУП

Метаболічний синдром (МС) – це складна багатокомпонентна патологія, яка носить мультисистемний характер та включає ожиріння, розвиток резистентності тканин до інсуліну, цукровий діабет (ЦД) 2 типу, артеріальну гіпертензію, атеросклероз тощо. Розвиток більшості з цих факторів є незворотнім, тому ефективність лікування буде максимальною за впливу на початкові етапи їх формування. Дослідження процесів, які є першопричиною розвитку цих порушень, та пошук нових шляхів їх корекції є на сьогодні перспективним напрямком науки.

Інсулінорезистентність (ІР) – це патологічний стан, який характеризується відсутністю ефектів інсуліну на інсулін-залежні тканини за його фізіологічних концентрацій. За даними літературних джерел розвиток ІР тісно корелює з ожирінням та порушенням обміну ліпідів [4, 6, 12]. За умов розростання жирової тканини надмірна кількість продуктів метаболізму адипоцитів призводить до накопичення в крові вільних жирних кислот (ВЖК), кортизолу та прозапальних цитокінів (інтерлейкіну-6, фактора некрозу пухлини- α (ФНП- α), інтерферону- γ , резистину тощо). Інтенсивна продукція біологічно активних сполук стимулює надлишкову генерацію активних форм кисню

(АФК), що призводить до розвитку оксидативного стресу та порушення внутрішньоклітинних метаболічних процесів, зокрема біосигналіngu. За таких умов рецептори інсуліну частково або повністю втрачають тирозин-кіназну активність, що перешкоджає фосфорильованню субстратів рецептора інсуліну (IRS-1/3), активації вторинних месенджерів та подальшій транслокації GLUT-4 до біологічних мембран клітини. При цьому рівень інсуліну в крові компенсаторно зростає, що обтяжує перебіг ІР [1, 15]. Жирова тканина є продуцентом адипонектину, який має антидіабетичні, антиатерогенні та протизапальні властивості [5, 8, 12]. Зростання рівня адипонектину за лікування метаболічного синдрому можна вважати маркером ефективності терапії.

До схем фармакологічної корекції МС входить значна кількість препаратів, проте особливу увагу привертають речовини природного походження. Аналіз літературних даних свідчить про те, що перспективним засобом корекції ІР є гідроксylimонна кислота (ГЛК), здатна підвищувати рівень адипонектину, що додатково сприяє зростанню чутливості клітин до інсуліну та чинить нормалізуючий вплив на метаболізм вуглеводів та ліпідів [2, 3, 5].

Метою нашої роботи було дослідження динаміки біохімічних змін при введенні ГЛК за умов експериментальної інсулінорезистентності у щурів.

ВПЛИВ ГІДРОКСИЛИМОННОЇ КИСЛОТИ НА РІВЕНЬ ГЛЮКОЗИ ТА ІМУНОРЕАКТИВНОГО ІНСУЛІНУ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ІНСУЛІНОРЕЗИСТЕНТНОСТІ У ЩУРІВ

Показники	Експериментальні групи тварин		
	інтактний контроль	модельна патологія	гідроксилимонна кислота
Глюкоза, ммоль/л	5,60 ± 0,39	10,70 ± 0,32*	7,78 ± 0,26*/**
ІРІ, пмоль/л	92,200 ± 2,804	137,750 ± 2,540*	98,604 ± 3,140**

Примітка: * – зміни достовірні відносно показників інтактного контролю ($p \leq 0,05$); ** – зміни достовірні відносно показників контрольної патології ($p \leq 0,05$).

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Wis-tar масою 160-200 г. Протягом 5 тижнів тваринам вводили внутрішньоочеревинно низькі дози (15 мкг/кг) дексаметазону при одночасному утримуванні на висококалорійній дієті (з додаванням фруктози 1 г/100 г маси тіла), що призводило до розвитку експериментальної ІР.

Тварини були поділені на 4 дослідні групи (по 10 щурів у кожній):

- Інтактний контроль (ІК) – здорові щури, які утримувались на стандартному харчовому раціоні віварію ЦНДЛ НФаУ.
- Модельна патологія (МП) – щури, яким моделювали ІР шляхом внутрішньоочеревинного щоденного введення низьких доз дексаметазону та утримання на висококалорійній дієті впродовж 5 тижнів.
- Щури з експериментальною ІР, яким внутрішньошлунково за допомогою металевого зонду у вигляді водної суспензії вводили екстракт ГЛК (доза 5 мг/кг).
- Здорові щури, яких утримували на стандартному раціоні віварію та вводили внутрішньошлунково за допомогою металевого зонду у вигляді водної суспензії екстракт ГЛК (доза 5 мг/кг).

Для оцінки результатів експерименту у сироватці крові тварин визначали рівень глюкози (визначали глюкозо-оксидазним методом), концентрацію імунорезистивного інсуліну (ІРІ) (радіоімунологічним методом за допомогою набору «РІО-ІНС-ПГ-1251», Беларусь). Рівень адипонектину визначали з використанням стандартного набору реактивів (BioSource, Бельгія), рівень резистину – набору реактивів (Nivelle, Бельгія), вміст ФНП- α визначали за допомогою імуноферментного методу із застосуванням тест-систем ТОВ «УкрмедДон» (Україна).

Дослідження проводили з дотриманням «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), узгоджених з «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985) та Етичним Кодексом Всесвітньої Медичної Асоціації (Гельсінська декларація, 1964).

Статистичний аналіз отриманих даних проводили за допомогою програми STATISTICA (StatSoft Inc., США, версія 6.0).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Щоденне введення щурам низьких доз дексаметазону та утримання їх на висококалорійній дієті призводило до розвитку експериментальної ІР, що є основною патогенетичною ланкою МС. Спостерігалось достовірне збільшення концентрації глюкози (у 1,91 рази відносно групи ІК), одночасно достовірно зростав рівень ІРІ у щурів групи МП (у 1,5 разів відносно ІК) (табл. 1).

Розвиток ІР спричиняв збільшення об'єму жирової тканини, що призводило до дисбалансу продукції цитокінів адипоцитами. Це супроводжувалось розвитком оксидативного стресу та зумовлювало підвищення продукції прозапальних цитокінів.

Розвиток ІР супроводжувався достовірним зменшенням вмісту адипонектину в крові дослідних тварин у 2,01 рази відносно групи ІК. Відомо, що вміст адипонектину зворотно корелює з масою жирової тканини. При цьому вміст прозапальних цитокінів – ФНП- α та резистину у щурів групи МП достовірно зростав відносно ІК (у 1,44 та 1,70 рази відповідно).

ФНП- α та резистин – це біологічно активні сполуки, здатні порушувати чутливість рецепторів клітин до інсуліну та активувати гіпоталамо-гіпофізарно-надниркову вісь. ФНП- α стимулював утворення адренкортикотропного гормону, що проявлялось у зростанні рівня кортикостерону в крові щурів (у 1,85 рази). Резистин через механізм індукції процесів запалення порушував трансдукцію сигналу інсуліну (що проявлялось гіперінсулінемією) та підвищував рівень глюкози в крові (через активацію глюконеогенезу). ФНП- α та резистин пригнічували утворення адипонектину в жировій тканині (табл. 2).

Внутрішньошлункове введення ГЛК щурам із експериментальною ІР впродовж 2 тижнів призводило до достовірного зниження вмісту кортикостерону у сироватці крові практично до показників ІК (в 1,78 рази). Разом з тим зменшувався рівень прозапальних цитокінів – ФНП- α та резистину (у 1,29 та 1,39 рази відповідно) відносно тварин групи МП, що проявлялось у пригніченні процесів вільнорадикального окиснення в клітинах (зокрема, адипоцитах) та відновленні продукції адипонектину (рівень якого в крові зростав майже до показників ІК).

Відомо, що адипонектин здатен підвищувати чутливість клітин м'язів та жирової тканини до дії інсу-

Таблиця 2

ВПЛИВ ГІДРОКСИЛИМОННОЇ КИСЛОТИ НА ПОКАЗНИКИ ЦИТОКІНОВОГО ПРОФІЛЮ ТА ВМІСТ КОРТИЗОЛУ В КРОВІ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ІНСУЛІНОРЕЗИСТЕНТНОСТІ У ЩУРІВ

Показники	Експериментальні групи тварин		
	інтактний контроль	модельна патологія	гідроксилимонна кислота
Адипонектин, нг/мл	262,28 ± 11,90	129,85 ± 10,35*	248,11 ± 11,18**
Кортикостерон, нг/мл	320,64 ± 11,26	594,47 ± 15,35*	334,26 ± 12,64**
ФНП-α, пг/мл	7,74 ± 0,04	11,12 ± 0,05*	8,64 ± 0,07**
Резистин, нг/мл	97,65 ± 8,74	165,84 ± 10,95*	119,40 ± 9,55**

Примітка: * – зміни достовірні відносно показників інтактного контролю ($p \leq 0,05$); ** – зміни достовірні відносно показників контрольної патології ($p \leq 0,05$).

ліну, сприятливо впливати на метаболічну активність адипоцитів: пригнічувати продукцію прозапальних цитокінів, нівелювати гіпертриацилгліцеролемію (шляхом індукції ключових ферментів β -окиснення), пригнічувати гліюконеогенез у печінці [8, 11]. Імовірно, терапевтичний ефект ГЛК за експериментальної ІР реалізується за декількома механізмами, зокрема, через нормалізацію рівня адипонектину.

Корекція виразності ІР, що спостерігалася на тлі тривалого введення ГЛК, підтверджувалась достовірним зменшенням виразності гіперглікемії та гіперінсулінемії практично до рівня ІК. Імовірно, нормалізація зазначених показників при введенні досліджуваної речовини, схоже, відбувається завдяки стимулюючому впливу на активність ферментів антиоксидантних систем організму, зокрема, супероксиддисмутази (СОД) та глутатіонредуктази, що узгоджується з даними наукової літератури [9, 13]. Нормалізація антиоксидантної рівноваги сприяє зниженню рівня прозапальних цитокінів, відновленню процесів сигнальної трансдукції, що поновлює тирозинкіназну активність рецептора інсуліну відносно IRS-1 та IRS-3. Пригнічення виразності оксидативного стресу та відновлення механізмів біосигналіну підвищують рівень інтеграції GLUT-4 до біологічних мембран, що забезпечує нормалізацію надходження глюкози до клітини.

Таким чином, ми можемо припустити, що ГЛК має здатність корегувати ІР, імовірно, за рахунок підвищення рівня продукції адипонектину та зниження рівня прозапальних цитокінів через активацію антиоксидантних ферментативних систем, що потребує подальших досліджень.

ВИСНОВКИ

1. Щоденне внутрішньоочеревинне введення низьких доз дексаметазону та утримання щурів на гіперкалорійній дієті призводять до збільшення маси тіла у тварин та розвитку ІР, що супроводжується змінами у метаболізмі жирової тканини та процесах обміну вуглеводів.
2. Прогресуюча ІР за умов дексаметазонової моделі є головною причиною порушення надходження глюкози до клітин інсулін-залежних органів

- і тканин, що супроводжується формуванням стійкої глюкоземії та подальшим розвитком ожиріння.
3. Розростання площі жирової тканини на фоні експериментальної ІР призводить до гіперпродукції прозапальних цитокінів (ФНП-α, резистину) та зменшення утворення інсулін-сенсibiliзуючого цитокіну – адипонектину.
4. Щоденне внутрішньошлункове введення екстракту ГЛК приводить до достовірного зменшення рівня гіперглікемії та гіперінсулінемії, нормалізації цитокінового профілю та відновлення продукції адипонектину, що, в свою чергу, додатково вказує на позитивну дію досліджуваної речовини.
5. Введення досліджуваного препарату тваринам, яких утримували на стандартному раціоні віварію, не призводить до змін показників речовин, що вивчались у ході експерименту.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Anusree S. S. An in vitro study reveals nutraceutical potential of puniceic acid relevant to diabetes via enhanced GLUT4 expression and adiponectin secretion / [S. S. Anusree, A. Priyanka, V. M. Nisha et al.] // Food Funct. – 2014. – Vol. 48. – P. 348-357.
2. Asghar M. Super CitriMax (HCA-SX) attenuates increases in oxidative stress, inflammation, insulin resistance, and body weight in developing obese Zucker rats / M. Asghar // Molecular and cellular biochem. – 2007. – P. 93-99.
3. Babio N. Evaluation of the safety and efficacy of hydroxycitric acid or Garcinia cambogia extracts in humans / N. Babio, M. Bull, J. Salas-Salvadó // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. – 2012. – Vol. 5. – P. 585-594.
4. Emanuela F. Inflammation as a link between obesity and metabolic syndrome / [F. Emanuela, M. Grazia, D. R. Marco et al.] // J. Nutr. Met. – 2012. – 476380. Article ID 476380.
5. Liu Guanxing. Garcinia Cambogia Extracts Prevented Fat Accumulation via Adiponectin-AMPK Signaling Pathway in Developing Obesity Rats / Liu Guanxing // Food Sci. and Technol. Res. – 2015. – P. 835-845.
6. Hong E. Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cyto-

- kine response in skeletal muscle / [E. Hong, H. J. Ko, Y. Cho et al.] // *Diabetes*. – 2009. – Vol. 58. – P. 2525-2535.
7. Kawasaki N. Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue / [N. Kawasaki, R. Asada, A. Saito et al.] // *Sci. Rep.* – 2012. – Vol. 2. – P. 799.
 8. Koh E. H. Essential role of mitochondrial function in adiponectin synthesis in adipocytes / [E. H. Koh, J. Park, H. Park et al.] // *Diabetes*. – 2007. – Vol. 56. – P. 2949-2953.
 9. Panda V. Antioxidant and hepatoprotective effect of *Garcinia indica* fruit rind in ethanol-induced hepatic damage in rodents / V. Panda, H. Ashar, S. Srinath // *Interdiscip. Toxicol.* – 2012. – Vol. 5. – P. 207-213.
 10. Priyanka A. Bilobalide attenuates hypoxia induced oxidative stress, inflammation, and mitochondrial dysfunctions in 3T3 L1 adipocytes via its antioxidant potential / A. Priyanka, V. Nisha, S. Anusree, K. G. Raghu // *Free Radic. Res.* – 2014. – Vol. 48. – P. 1206-1217.
 11. Rodina A. V. The role of adiponectin in the pathogenesis of the metabolic syndrome and approach to therapy / A. V. Rodina, S. E. Severin // *Patologicheskaia fiziologiya i eksperimental'naia terapiia*. – 2012. – P. 15-26.
 12. Sun W. L. Inflammatory cytokines, adiponectin, insulin resistance and metabolic control after periodontal intervention in patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis / [W. L. Sun, L. L. Chen, S. Z. Zhang, et al.] // *Intern. Med.* – 2011. – Vol. 50. – P. 1569-1574.
 13. Surapaneni K. M. Comparative effect of pioglitazone, quercetin and hydroxy citric acid on the status of lipid peroxidation and antioxidants in experimental non-alcoholic steatohepatitis / K. M. Surapaneni, M. J. Jainu // *Physiol. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 65. – P. 67-74.
 14. Yamada T. Chemistry, physiological properties and microbial production of hydroxyl citric acid / T. Yamada, H. Hida, Y. Yamada // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 75. – P. 977-982.
 15. Zha B. S. ER stress and lipid metabolism in adipocytes / B. S. Zha, H. Zhou // *Biochem. Res. Int.* – 2012. – P. 312943.

УДК 616 – 056.257-089+615.874.2+615.241.24+577.125: 57.044**А. Л. Загайко, А. И. Шкапо, Т. А. Брюханова****ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ЛЕЧЕБНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ГИДРОКСИЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У КРЫС**

В результате проведенных исследований было установлено, что длительное внутрибрюшинное введение низких доз дексаметазона в сочетании с высококалорийной диетой приводят к формированию синдрома инсулинорезистентности у крыс. На фоне развития данной патологии наблюдалось разрастание жировой ткани, что сопровождалось увеличением концентрации глюкозы в крови, повышением содержания кортикостерона и нарушением баланса цитокинового профиля (фактор некроза опухоли- α , резистин и адипонектин), которые синтезируются адипоцитами. Было показано, что ежедневное внутрижелудочное введение гидроксимилимонной кислоты в течение 3 недель приводит к нормализации указанных показателей, а именно к снижению уровня глюкозы и кортикостерона в сыворотке крови, устранению негативных изменений цитокинового профиля. Здоровые животные, которые содержались на стандартном пищевом рационе вивария, не имели изменений исследуемых показателей на фоне длительного приема гидроксимилимонной кислоты.

Ключевые слова: инсулинорезистентность; фактор некроза опухоли- α ; резистин; адипонектин; гидроксимилимонная кислота

UDC 616 – 056.257-089+615.874.2+615.241.24+577.125: 57.044**A. L. Zagayko, A. I. Shkapo, T. O. Briukhanova****THE INVESTIGATION MECHANISMS OF THE HYDROXYCITRIC ACID THERAPEUTIC EFFECTS UNDER THE EXPERIMENTAL INSULIN RESISTANCE IN RATS**

As a result of studies have shown that prolonged intraperitoneal injection of dexamethasone in low doses and its combination with high-calorie diet leads to formation of the insulin resistance syndrome in rats. Against of this pathology background was observed adipose tissue growth, which was accompanied by an increase in blood glucose, corticosterone and the imbalance of the cytokine profile (tumor necrosis factor- α , resistin and adiponectin), which are synthesized by adipocytes. It was shown that a daily intragastric hydroxycitric acid administration during 3 weeks leads to normalization of these indicators: reduced serum glucose and corticosterone, eliminating adverse changes in cytokine profile. Healthy animals, which were kept on a standard vivarium diet had no change studied parameters on the prolonged hydroxycitric acid used background.

Key words: insulin resistance; tumor necrosis factor- α ; resistin; adiponectin; hydroxycitric acid