

DOI: 10.31793/1680-1466.2021.26-4.357

# Вплив дапагліфлозину на активність ангіотензин-перетворюючого ферменту в структурах гіпоталамо-гіпофізарно-адренокортикальної системи та функцію кори надниркових залоз у щурів із цукровим діабетом 2-го типу

Л.М. Калинська,  
О.І. Ковзун

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

**Резюме. Мета** роботи — дослідити вплив інгібітору натрійзалежного котранспортера глюкози 2 (НЗКТГ2) — дапагліфлозину (ДФ) на активність ангіотензин-перетворюючого ферменту (АПФ) у центрах регуляції гіпоталамо-гіпофізарно-адренокортикальної системи (ГГАС), а також рівень кортикостероїдів та активність АПФ у сироватці крові щурів із цукровим діабетом 2-го типу (ЦД2). **Матеріал і методи.** ЦД2 в щурів самців моделювали за допомогою висококалорійної дієти (ВКД) та ін'єкцій низьких доз стрептозотоцину (15 і 25 мг/кг). Суспензію ДФ вводили щурам із ЦД2 *per os* у дозі 1 мг/кг один раз на добу впродовж 8 діб. Активність АПФ в структурах ГГАС (гіпоталамусі, гіпофізі та надниркових залозах) і сироватці крові щурів визначали флуориметричним методом із використанням субстрату Benzoyl-Gly-His-Leu («Sigma», США). Вміст 11-гідроксикортикостероїдів (11-ОКС) у сироватці крові щурів вимірювали флуориметричним мікрометодом. **Результати.** Показано, що в щурів на ранній стадії розвитку ЦД2 (через 2 тижні після порушення толерантності до глюкози та підвищення рівня базальної глікемії) активність АПФ у структурах ГГАС і в сироватці крові не відрізняється від активності ферменту в контролі. У нейрогіпофізі щурів із двотижневим ЦД2 на відміну від структур ГГАС виявлено суттєве підвищення рівня білкових і пептидних речовин. У сироватці крові щурів із ЦД2 виявлено підвищення рівня 11-ОКС. Введення щурам із ЦД2 ДФ протягом 8 днів призводить до зниження ктивності АПФ та рівня 11-ОКС у сироватці крові. У надниркових залозах цих тварин активність АПФ має тенденцію до зниження.

## Оригінальні дослідження

Дослідження ефекту введення ДГФ у центральних ланках ГГАС виявили значне підвищення активності АПФ в аденогіпофізі щурів із ЦД2. **Висновки.** На ранній стадії розвитку ЦД2 АПФ не приймає участь у порушенні функції ГГАС — змін активності ферменту в гіпоталамусі, аденогіпофізі та надниркових залозах не виявлено. Підвищення рівнів білкових і пептидних речовин у нейрогіпофізі щурів на ранній стадії ЦД2 свідчить про посилення біосинтезу нанопептидних гормонів, зокрема окситоцину і вазопресину. Наслідком прямої дії цих гормонів, очевидно, є виявлене нами підвищення секреторної активності надниркової ланки ГГАС, зокрема рівня кортикостероїдів. Зниження активності сироваткового АПФ та рівня кортикостероїдів після 8-денного введення ДГФ щурам із ЦД2 можуть бути важливими чинниками, які забезпечують зниження інсулінорезистентності, формування якої посилює ангіотензинова система, а також сприяють зниженню артеріального тиску, що позитивно впливає на функції нирок та систему кровообігу.

**Ключові слова:** Ангіотензин-перетворюючий фермент, гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальна система, дапагліфлозин, кортикостероїди.

Інгібіторам НЗКТГ2 — новому класу цукрознижувальних препаратів притаманний унікальний, незалежний від інсуліну, механізм дії [1, 2]. Окрім покращення контролю глікемії, інгібітори НЗКТГ2 сприяють помірному зниженню маси тіла, артеріального тиску та підвищенню чутливості тканин до інсуліну. Завдяки здатності позитивно впливати на провідні чинники серцево-судинного ризику, а також натрійуретичну дію інгібітори НЗКТГ2 є препаратами вибору у хворих на ЦД2 і серцево-судинні захворювання атеросклеротичного генезу [3-5].

Важливу роль у патофізіологічному ремоделюванні тканин та прогресуванні патології органів за умов цукрового діабету (ЦД) відіграють аутокринні/паракринні ефекти локально синтезованого в різних органах і тканинах ангіотензину II [6-8], зокрема в ГГАС, функції якої за ЦД значно порушені [9-11]. Показано, що висока активність компонентів ренін-ангіотензин-альдостеронової системи в системній циркуляції, зокрема, активність АПФ та рівень ангіотензину II, підсилюють два провідних механізми, які лежать в основі розвитку ЦД2 — зростання інсулінорезистентності периферичних тканин і зниження синтезу інсуліну клітинами Лангерганса [12, 13].

**Метою** роботи було дослідити вплив перорального введення інгібітору НЗКТГ2 — ДГФ на активність АПФ у центрах регуляції ГГАС, а також на рівень кортикостероїдів та активність АПФ у сироватці крові щурів із ЦД2.

## Матеріал і методи

Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Вістар із початковою масою тіла 120-180 г віком 1,5-2 місяці. Умови утримання та використання тварин в експериментах відповідали біоетичним вимогам «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальними та іншими науковими цілями» (Страсбург, 18 березня 1986 р.) та «Рекомендаціями Першого національного конгресу з біоетики» (Київ, 20 вересня 2001 р.). Проект дослідження схвалено Комісією з питань біоетики ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України» (протокол № 26-КЕ від 10.04.2019 р.).

ЦД2 моделювали у два етапи [14, 15]. Перший етап: утримання щурів на ВКД (15% жиру, 25% сахарози, 1% жовчних кислот і 59% стандартного раціону) впродовж 6 місяців. Другий етап: щурам, яких утримували на ВКД внутрішньочеревинно вводили стрептозоточин (СТЦ) у дозі 15 та 25 мг/кг маси тіла з інтервалом в один тиждень. Контрольні тварини отримували стандартну дієту віварію та воду *ad libitum*.

Розвиток ЦД2 в щурів контролювали за рівнем глікемії натще та під час проведення тесту толерантності до глюкози. Тварин із порушеною толерантністю до вуглеводів було розподілено на 2 групи: щурів із ЦД2 та щурів із ЦД2, які отримували суспензію ДГФ *per os* у дозі 1 мг/кг маси тіла один раз на добу

впродовж 8 діб. Тварин декапітували під нембуталовим наркозом на 28 тиждень навантаження ВКД, через 2 тижні після констатації підвищення рівня глікемії натще та порушення толерантності до глюкози.

Активність АПФ у гомогенатах гіпоталамуса, аденогіпофіза та надниркових залоз визначали флуориметричним методом із використанням субстрату Benzoyl-Gly-His-Leu («Sigma», США) [16]. Активність ферменту виражали в нмоль His-Leu, який відщепився за 1 хв інкубації в розрахунку на 1 мг білка та 0,1 г тканини. Активність АПФ у сироватці крові визначали за методом Павліхіної Л.В. [17]. Концентрацію 11-ОКС у сироватці крові щурів визначали із застосуванням флуориметричного методу De Moore в модифікації Ю.Г. Балашова [18]. Рівень глюкози в крові, яку забирали з хвостової вени щурів, визначали глюкозооксидазним методом за допомогою глюкометра «Accu-Chek Active» (Німеччина). Вміст білка визначали за Лоурі [19].

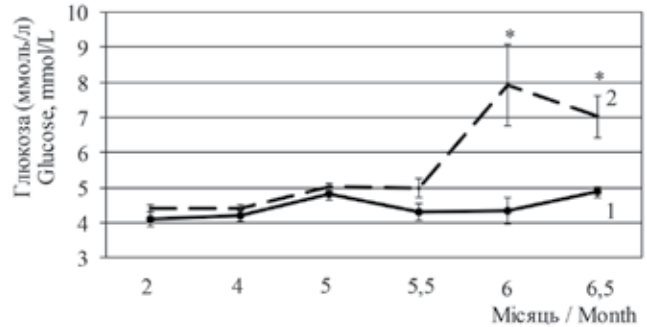
Статистичну обробку результатів здійснювали з використанням t-критерію Стьюдента.

## Результати та обговорення

За умов обраної експериментальної моделі ЦД2 було встановлено, що застосування ВКД впродовж 6 місяців спричиняло збільшення приросту маси тіла щурів-самців на 56,39% (від  $70,4 \pm 10,0\%$  у контрольній групі щурів до  $110,10 \pm 6,98\%$  у групі щурів із ЦД2,  $p < 0,01$ ) за рахунок маси вісцерального жиру.

Водночас відбувалось поступове зростання рівня глюкози в крові тварин. У щурів, що утримувались на ВКД, на шостий місяць експерименту було зафіксовано підвищення рівня базальної глікемії (рис. 1), а також порушення толерантності до глюкози із суттєвим збільшенням амплітуди глікемічної кривої з показниками  $14,7 \pm 1,93$  ммоль/л (при амплітуді контролю  $5,70 \pm 0,18$  ммоль/л).

Результати досліджень показали, що активність АПФ у гіпоталамусі, аденогіпофізі та надниркових залозах щурів на ранній стадії розвитку ЦД2, який індукували довготривалим навантаженням ВКД та введенням низьких доз стрептозотоцину, порівняно з контрольною групою тварин суттєво не змінюється (рис. 2).

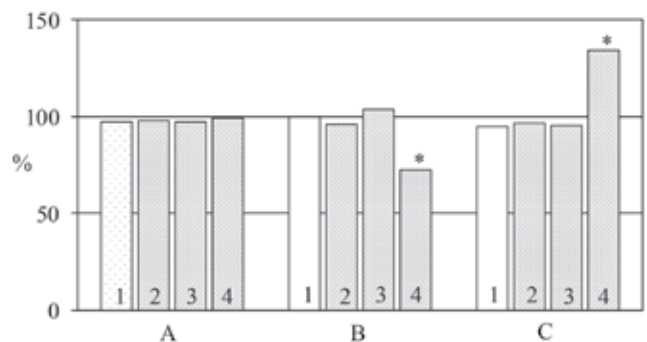


**Рис. 1.** Вміст глюкози в крові інтактних щурів (контроль) та щурів із ЦД2, який індукували навантаженням ВКД протягом 6 місяців та введенням низьких доз стрептозотоцину ( $n=8-10$ ).

Примітка: 1 — контроль, 2 — ЦД2; \* — вірогідна різниця порівняно з групою 1 ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 1.** Blood glucose content in intact rats (control) and rats with type 2 diabetes mellitus, which was induced by loading of HCD for 6 months and the administration of low doses of Streptozotocin ( $n=8-10$ ).

Note: 1 — control, 2 — type 2 diabetes mellitus; \* — significant difference compared with the group 1 ( $p < 0.05$ ).



**Рис. 2.** Активність АПФ та вміст білків у гіпоталамусі, гіпофізі та надниркових залозах щурів із ЦД2 порівняно з контролем, прийнятим за 100% ( $n=6-8$ ).

Примітка: А — активність АПФ у розрахунку на тканину, В — активність АПФ у розрахунку на білок, С — вміст білків; 1 — гіпоталамус, 2 — аденогіпофіз, 3 — надниркові залози, 4 — нейрогіпофіз; \* — вірогідна різниця порівняно з контролем, прийнятим за 100% ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 2.** Angiotensin-converting enzyme activity and protein content in the hypothalamus, pituitary gland and adrenal glands of rats with type 2 diabetes mellitus deviations from control taken for 100% ( $n=6-8$ ).

Note: A — ACE activity per tissue, B — ACE activity per protein, C — protein content; 1 — hypothalamus, 2 — adenohypophysis, 3 — adrenal glands, 4 — neurohypophysis; \* — significant difference compared with the control taken for 100% ( $p < 0.05$ ).

У сироватці крові щурів з експериментальним ЦД2 змін активності АПФ порівняно з контрольними тваринами також не виявлено ( $7,04 \pm 0,17$  нмоль гіс-лей/мл проти  $6,96 \pm 0,32$  нмоль гіс-лей/мл,  $p > 0,5$ ).

## Оригінальні дослідження

Відсутність змін активності АПФ у структурах ГГАС встановлено при розрахунку активності ферменту на 0,1 г тканини та на 1 мг білків. Згідно з одержаними даними, вміст білків у гіпоталамусі, аденогіпофізі та надниркових залозах щурів із ЦД2 також не змінюється (рис. 2).

Дослідження ефекту ДГФ показало, що введення препарату щурам із ЦД2 протягом 8 днів не спричиняє суттєвих змін активності АПФ у гіпоталамусі. Значні зміни активності АПФ виявлені в аденогіпофізі – підвищення активності ферменту спостерігається в розрахунку на 0,1 г тканини й на 1 мг білка (рис. 3).

На відміну від цього, у надниркових залозах щурів із ЦД2, яким вводили ДГФ, активність АПФ має тенденцію до зниження порівняно з групою щурів із ЦД2 ( $0,25 \pm 0,01$  нмоль гіс-лей/мг білка проти  $0,28 \pm 0,01$  нмоль гіс-лей/мг білка,  $0,1 > p > 0,05$ ) (рис. 3). У сироватці крові щурів із ЦД2 виявлено вірогідне зниження активності АПФ після введення ДГФ протягом 8 днів (із  $7,04 \pm 0,17$  нмоль гіс-лей/мл до  $6,39 \pm 0,18$  нмоль гіс-лей/мл,  $p < 0,05$ ).

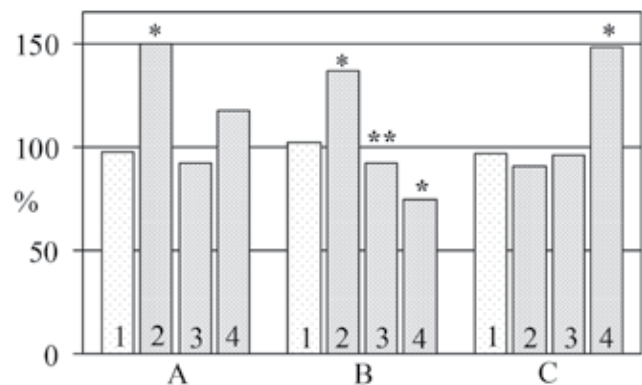
На ранній стадії розвитку ЦД2 в нейрогіпофізі щурів, на відміну від структур ГГАС, виявлено суттєве підвищення рівня білків і пептидів (рис. 2). У зв'язку з цим, активність АПФ у нейрогіпофізі в розрахунку на білок виявилася зниженою. Згідно одержаних

даних, введення ДГФ протягом 8 днів не впливає на рівень білків та активність АПФ в нейрогіпофізі щурів із ЦД2. Так, порівняно з контрольною групою тварин рівень білків у нейрогіпофізі залишається підвищеним, а активність АПФ у розрахунку на білок знижена (рис. 3).

Відомо, що в нейрогіпофізі накопичуються пептидні нейрогормони, зокрема вазопресин і окситоцин, які утворюються в ядрах гіпоталамусу і надходять у нейрогіпофіз по аксонам нейросекреторних нейронів [20, 21]. Підвищення вмісту білкових і пептидних речовин у нейрогіпофізі щурів із ЦД2, очевидно, пов'язано з посиленням біосинтезу нанопептидних гормонів, зокрема, вазопресину, який здійснює вазоконстрикторну, гіперглікемічну та антидіуретичну дію та стимулює надниркові залози.

Незважаючи на розбіжності щодо морфогістохімічних змін у структурах ГГАС в більшості досліджень виявлені порушення функціональної активності цієї системи за умов розвитку експериментального ЦД [10, 22]. У наших експериментах на ранній стадії розвитку ЦД2 виявлено підвищення рівня 11-ОКС у сироватці крові щурів (із  $572,3 \pm 12,7$  нмоль/л у контролі до  $809,7 \pm 66,8$  нмоль/л у щурів із ЦД2,  $p < 0,01$ ). Водночас введення ДГФ щурам із ЦД2 протягом 8 днів призводить до зниження рівня 11-ОКС у сироватці крові (із  $809,7 \pm 66,8$  нмоль/л до  $579,6 \pm 17,7$  нмоль/л,  $p < 0,01$ ).

Отже, за результатами проведеного дослідження встановлено, що в щурів у ранні строки розвитку ЦД2 активність АПФ у структурах ГГАС і плазмі крові не відрізняється від показника в контрольних щурів. Подібні результати були виявлені нами раніше при дослідженні динаміки змін АПФ за умов розвитку експериментального цукрового діабету 1-го типу (ЦД1) протягом 4 місяців. Зокрема, у ранній період (до 2 тижнів) розвитку ЦД1 не відмічено змін активності АПФ у надниркових залозах та плазмі крові щурів. Суттєві порушення протеолітичного процесингу ангіотензину II за участю АПФ, а також рецепції цього пептиду спостерігаються в структурах ГГАС, зокрема, надниркових залозах, а також у плазмі крові щурів у пізні періоди розвитку ЦД1 – через 2, 3, і 4 місяці після індукції ЦД [11].



**Рис. 3.** Активність АПФ та вміст білків у гіпоталамусі, гіпофізі та надниркових залозах після 8-денного введення ДГФ щурам із ЦД2 порівняно з контролем, прийнятим за 100% ( $n=6-8$ ).

Примітка: див. примітку до рис. 2.

**Fig. 3.** Angiotensin-converting enzyme activity and protein content in the hypothalamus, pituitary gland and adrenal glands in 8 days after administration of dapagliflozin to rats with type 2 diabetes mellitus deviations from control taken for 100% ( $n=6-8$ ).

Note: see note to fig. 2.

Аналіз проведених нами клінічних досліджень показав, що активність АПФ у сироватці крові хворих на ЦД2 залежить від стадії розвитку ЦД і визначається інсулінемією [23]. Найвища активність ферменту виявлена в чоловіків з інсулінодефіцитом і вона не відрізняється від контролю у хворих на стадії інсулінорезистентності. Результати цих клінічних досліджень та одержані нами в експерименті дані про відсутність змін активності АПФ у структурах ГГАС і крові щурів на ранній стадії ЦД2 узгоджуються з результатами досліджень, які показали, що в осіб без метаболічних порушень інгібітори АПФ не впливають на толерантність до глюкози та показники вуглеводного і ліпідного обміну. Тенденція до підвищення активності сироваткового АПФ була виявлена при метаболічному синдромі в разі зростання ступеня ожиріння. Вищий рівень активності АПФ крові виявлено при гіпертригліцеридемії та підвищенні рівня ліпопротеїдів дуже низької щільності [24-26].

Поряд із відсутністю змін активності АПФ і рівня білків у структурах ГГАС щурів на ранній стадії ЦД2 в наших дослідженнях виявлено суттєве підвищення рівня білкових і пептидних речовин у нейрогіпофізі щурів із ЦД2. Це очевидно, пов'язано з активацією гіпоталамо-нейрогіпофізарної системи, зокрема нейросекреторних ядер гіпоталамуса, і, як наслідок, посилення біосинтезу нанопептидних гормонів та підвищення концентрації вазопресину та окситоцину в нейрогіпофізі щурів на ранніх етапах розвитку ЦД2. Активація вазопресин-, кортиколіберин- і окситоцин-синтезуючої системи гіпоталамуса щурів за умов експериментального стрептозотоциніндукованого діабету тривалістю 2 і 5 тижнів показана за даними морфогістохімічних досліджень відповідних структур гіпоталамуса та підтверджена підвищенням концентрації вазопресину, кортиколіберину і кортизону в периферичній крові щурів із ЦД1 [27, 28]. До того ж показано, що для ЦД характерно підвищення рівня мРНК кортикотропін-релізинг гормону в паравентрикулярних ядрах гіпоталамуса, яке свідчить про стимуляцію гіпоталамічних ядер і призводить до підвищення рівня вазопресину та окситоцину в нейрогіпофізі [10, 29, 30].

Необхідно підкреслити, що КРФ та інші пептиди, яким притаманна кортикотропін-релізинг активність (вазопресин, окситоцин, ангіотензин II, брадикінін тощо) відіграють різну фізіологічну роль у реакції ГГАС на дію екстремальних факторів та за умов патології [9, 21, 28]. Виявлене в наших експериментах підвищення секреторної активності надниркової ланки ГГАС (зокрема кортикостероїдів) у щурів на ранній стадії ЦД2 може бути наслідком як прямої дії гормонів нейрогіпофіза вазопресину та окситоцину на синтез кортикостероїдів і АКТГ, так і підвищення чутливості надниркових залоз до дії різних кортикотропін-релізинг факторів, зокрема, ангіотензину II. У низці робіт встановлено підвищення рівня кортикостероїдів при нормальному рівні АКТГ [10, 20, 21].

ДГФ — представник нового класу пероральних цукрознижувальних препаратів поряд з основним механізмом дії — селективним інгібуванням основного переносника глюкози — НЗКТГ2 здатний підвищувати чутливість тканин до інсуліну та поліпшувати функцію  $\beta$ -клітин підшлункової залози. Важливо підкреслити, що НЗКТГ2 селективно експресується в нирках за відсутності експресії в 70 інших тканинах, зокрема печінці, скелетних м'язах, жировій тканині, структурах головного мозку тощо [2, 5]. За нашими даними, введення ДГФ щурам із ЦД2 протягом 8 днів призводить до зниження активності сироваткового АПФ. Тенденція до зниження активності ферменту спостерігається в надниркових залозах. Введення ДГФ призводить також до зниження рівня 11-ОКС у сироватці крові щурів із ЦД2. Реакція центральних структур ГГАС на зниження активності периферичних ланок ангіотензинової системи спостерігається в аденогіпофізі, в якому виявлено підвищення активності АПФ. Це свідчить про активацію локальної ангіотензинової системи в аденогіпофізі та включення ангіотензину II в механізми активації кортикотропної функції, тобто активації реакції аденогіпофіза на зниження рівня кортикостероїдів та активності АПФ у сироватці крові за умов введення ДГФ щурам із ЦД2.

Подібні зміни в різних системах ангіотензину II — зниження активності сироваткового АПФ та підвищення активності

## Оригінальні дослідження

ферменту в локальній гіпофізарній системі, очевидно, пов'язані з існуванням механізму зворотних зв'язків у ГГАС, зокрема, ангіотензин II, АКТГ — кортикостероїди. Важливо також підкреслити, що вміст білків і пептидів у нейрогіпофізі після введення ДГФ тваринам із ЦД2 залишається підвищеним. Це сприяє стимуляції секреції АКТГ, оскільки вазопресин, який надходить і накопичується в нейрогіпофізі, відіграє провідну роль в аденогіпофізарному гормонопоезі [10, 28].

Зниження активності АПФ у сироватці крові щурів із ЦД2 після 8-денного введення ДГФ, а також виявлена тенденція до зниження активності ферменту в надниркових залозах можуть здійснювати виразну дію, гальмуючи продукцію альдостерону як у надниркових залозах, так і на тканинному рівні. Крім того, виразність дії альдостерону знижується також за умов зниження тканинного вмісту натрію при введенні ДГФ, якому притаманна натрійуретична дія.

Відомо, що АПФ є одним із ферментів, які беруть участь у синтезі та реалізації дії біологічно-активних регуляторних пептидів та є мішенню для фармакологічних втручань [6, 9, 31]. Зниження активності сироваткового АПФ та рівня кортикостероїдів у щурів із ЦД2 після 8-денного введення ДГФ можуть бути важливими чинниками, які забезпечують зниження інсулінорезистентності (формування якої за допомогою різних механізмів посилює ангіотензинова система) і артеріального тиску, що позитивно впливає на функції нирок та систему кровообігу.

## Висновки

- Показано, що в щурів на ранній стадії розвитку ЦД2 (2 тижні після підвищення рівня глікемії натще і порушення толерантності до глюкози) активність АПФ у структурах ГГАС — гіпоталамусі, аденогіпофізі та надниркових залозах не відрізняється від активності ферменту в контрольних щурів. Не виявлено змін активності АПФ у сироватці крові щурів із ЦД2.
- На відміну від структур ГГАС у нейрогіпофізі щурів на ранній стадії розвитку ЦД2 виявлено суттєве підвищення рівня білкових і пептидних речовин.
- У сироватці крові щурів із двотижневим ЦД2 встановлено підвищення рівня 11-ОКС.
- Після введення ДГФ (1 мг/кг) щурам із двотижневим ЦД2 протягом 8 днів спостерігається зниження активності сироваткового АПФ та тенденція до зниження активності ферменту в надниркових залозах.
- Введення ДГФ у дозі 1 мг/кг щурам із ЦД2 протягом 8 днів призводить до зниження рівня 11-ОКС у сироватці крові.
- Дослідження ефекту введення ДГФ у центральних ланках ГГАС щурів із ЦД2 виявили значне підвищення активності АПФ в аденогіпофізі.

## Список використаної літератури

- Washburn WN. Evolution of sodium glucose co-transporter 2 inhibitors as anti-diabetic agents. *Expert Opin Ther Pat.* 2009 Nov;19(11):1485-99. doi: 10.1517/13543770903337828.
- Merovci A, Mari A, Solis-Herrera C, Xiong J, Daniele G, Chavez-Velazquez A, et al. Dapagliflozin lowers plasma glucose concentration and improves  $\beta$ -cell function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 May;100(5):1927-32. doi: 10.1210/jc.2017-02166.
- Plosker GL. Dapagliflozin: a review of its use in patients with type 2 diabetes. *Drugs.* 2014 Dec;74(18):2191-209. doi: 10.1007/s40265-014-0324-3.
- Scheen AJ. Pharmacodynamics, efficacy and safety of sodium-glucose co-transporter type 2 (SGLT2) inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Drugs.* 2015 Jan;75(1):33-59. doi: 10.1007/s40265-014-0337-y.
- Sjöström CD, Johansson P, Ptaszynska A, List J, Johnsson E. Dapagliflozin lowers blood pressure in hypertensive and non-hypertensive patients with type 2 diabetes. *Diab Vasc Dis Res.* 2015 Sep;12(5):352-8. doi: 10.1177/1479164115585298.
- Hooper NM. Angiotensin converting enzyme: implications from molecular biology for its physiological functions. *Int J Biochem.* 1991;23(7-8):641-7. doi: 10.1016/0020-711x(91)90032-i.
- Anderson S. Role of local and systemic angiotensin in diabetic renal disease. *Kidney Int Suppl.* 1997 Dec;63: S107-10.
- Елисеєва ЮЕ. Ангиотензин-превращающий фермент, его физиологическая роль. *Вопросы медицинской химии.* 2001;47(1):43-54 (Elisseeva YuE. Angiotensin-converting enzyme, its physiological role. *Vopr Med Khim.* 2001 Jan-Feb;47(1):43-54. Russian).
- Калинська ЛМ. Роль ангіотензинів у нейроендокринній регуляції гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової системи у нормі та патології. *Ендокринологія.* 2000; 5(2):228-40 (Kalynska LM. The role of angiotensins in neuroendocrine regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal system in normal and pathology. *Endokrynologia.* 2000;5(2):228-40. Ukrainian).
- Мазуринка НК. Нарушения гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы при сахарном диабете. *Проблемы эндокринологии.* 2007;53(2):29-34 (Mazurina NK. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis disorders in diabetes. *Probl Endokrinol (Mosk).* 2007 Apr 15;53(2):29-34. Russian). doi: 10.14341/probl200753229-34.
- Калинська ЛМ, Єфімов АС. Динаміка компонентів ангіотензинової і калікреїн-кінінової систем та їх взаємодія в структурах гіпоталамо-гіпофізарно-адренокортикальної системи за умов розвитку стрептозотоцинового діабету. *Ендокринологія.* 2011;16(1):67-75 (Kalynska LM, Yefimov AS. Dynamics of components of angiotensin and kallikrein-kinin systems and their interaction in the structures of hypothalamus-pituitary-adrenocortical axis under development of streptozotocin-induced diabetes. *Endokrynologia.* 2011;16(1):67-75. Ukrainian).

12. Gaboury CL, Simonson DC, Seely EW, Hollenberg NK, Williams GH. Relation of pressor responsiveness to angiotensin II and insulin resistance in hypertension. *J Clin Invest.* 1994 Dec;94(6):2295-300. doi: 10.1172/JCI117593.
13. Nicola W, Sidhom G, El Khyat Z, Ibrahim S, Salah A, El Sayed A. Plasma angiotensin II, renin activity and serum angiotensin-converting enzyme activity in non-insulin dependent diabetes mellitus patients with diabetic nephropathy. *Endocr J.* 2001 Feb;48(1):25-31. doi: 10.1507/endocrj.48.25.
14. Lin S, Yang J, Wu G, Liu M, Luan X, Lv Q et al. Preventive effect of taurine on experimental type II diabetic nephropathy. *J Biomed Sci.* doi:10.1111/j.1471-4159.1972.tb01298.x.
15. Mansor LS, Gonzalez ER, Cole MA, Tyler DJ, Beeson JH, Clarke K, et al. Cardiac metabolism in a new rat model of type 2 diabetes using high-fat diet with low dose streptozotocin. *Cardiovasc Diabetol.* 2013 Sep 24;12:136. doi: 10.1186/1475-2840-12-136.
16. Yang HY, Neff NH. Distribution and properties of angiotensin converting enzyme of rat brain. *J Neurochem.* 1972 Oct;19(10):2443-50. doi:10.1111/j.1471-4159.1972.tb01298.x.
17. Павлихина ЛВ, Елисеєва ЮЕ, Поздnev ВФ, Орехович ВН. Определение активности карбоксикапепсина в сыворотке крови человека. *Вопр. мед. химии.* 1975;21(1):54-9 (Pavlikhina LV, Eliseeva IuE, Pozdnev VF, Orekhovich VN. Determination of carboxycathepsin (peptidyl dipeptidase) activity in human blood serum. *Vopr Med Khim.* 1975 Jan-Feb;21(1):54-60. Russian).
18. Балашов ЮГ. Флуориметрический микрометод определения кортикостероидов: сравнение с другими методами. *Физиол. журн. СССР.* 1990;76(2):280-3 (Balashov YuG. Fluorometric micro-method of corticosteroids determination; comparison with other methods. *Fiziologicheskij zhurnal SSSR.* 1990;76(2):280-3. Russian).
19. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.
20. Guillon G, Grazzini E, Andrez M, Breton C, Trueba M, Serradeil-LeGal C. Vasopressin: a potent autocrine/paracrine regulator of mammal adrenal functions. *Endocr Res.* 1998 Aug-Nov;24(3-4):703-10. doi:10.3109/07435809809032672.
21. Tanoue A, Ito S, Honda K, Oshikawa S, Kitagawa Y, Koshimizu TA, et al. The vasopressin V1b receptor critically regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity under both stress and resting conditions. *J Clin Invest.* 2004 Jan;113(2):302-9. doi:10.1172/JCI19656.
22. Шестакова СА, Степанов РП, Григоренко ГА, Федорова НВ, Тишкова ЮН. Антиоксидантная защита и структурные изменения в головном мозге у крыс при экспериментальном сахарном диабете. *Пробл. эндокринологии.* 2006;52(5):37-43 (Shestakova SA, Stepanov RP, Grigorenko GA, Fedorova NV, Tishkovskaya YuN. Antioxidative defense and structural changes in the brain of rats with experimental diabetes mellitus. *Problems of Endocrinology.* 2006;52(5):37-43. Russian).
23. Корпачева-Зинич ОВ, Калинская ЛМ. Активність сироваткового ангіотензин-перетворювального ферменту у хворих на цукровий діабет 2 типу залежно від статі та андрогенного забезпечення. *Укр. терапевт. журнал.* 2009;(1):68-75 (Korpacheva-Zinich OV, Kalynska LM. The activity of serum angiotensin-converting enzyme in patients with type 2 diabetes mellitus depending on gender and androgen supply. *Ukr Therap Zhurn.* 2009;(1):68-75).
24. Galletti F, Strazzullo P, Capaldo B, Carretta R, Fabris F, Ferrara LA, et al. Controlled study of the effect of angiotensin converting enzyme inhibition versus calcium-entry blockade on insulin sensitivity in overweight hypertensive patients: Trandolapril Italian Study (TRIS). *J Hypertens.* 1999 Mar;17(3):439-45. doi: 10.1097/00004872-199917030-00018.
25. Oksa A, Gajdos M, Fedelesová V, Spustová V, Dzürík R. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors on glucose and lipid metabolism in essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1994 Jan;23(1):79-86. doi: 10.1097/00005344-199401000-00010.
26. Kudoh A, Matsuki A. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors on glucose uptake. *Hypertension.* 2000 Aug;36(2):239-44. doi: 10.1161/01.hyp.36.2.239.
27. Колесник ЮМ, Орестенко ЮН, Абрамов АВ. Состояние вазопрессин-, окситоцин- и кортиколиберинсинтезирующих структур гипоталамуса при экспериментальном сахарном диабете у крыс различного пола. *Проблемы эндокринологии.* 1993;39(1):45-48 (Kolesnik YuM, Orestenko YuN, Abramov AV. Vasopressin, oxytocin, and corticoliberin-synthesizing hypothalamic structures in rats of both sexes with induced diabetes mellitus. *Problems of Endocrinology.* 1993;39(1):45-48. Russian).
28. Тржецинський СД. Вплив екзогенних нейропептидів на ендокринну функцію підшлункової залози та асоційовані метаболічні процеси в нормі і при цукровому діабеті (експериментальне дослідження) [дисертація]. Запоріжжя: Запорізький медичний університет; 2011. 376 с. (Trzhecynsky SD. Influence of exogenous neuropeptides on endocrine function of the pancreas and associated metabolic processes in normal and in diabetes mellitus (experimental study) [dissertation]. Zaporizhzhia: Zaporizhzhia Medical University; 2011. 376 p. Ukrainian).
29. Chan O, Chan S, Inouye K, Vranic M, Matthews SG. Molecular regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in streptozotocin-induced diabetes: effects of insulin treatment. *Endocrinology.* 2001 Nov;142(11):4872-9. doi: 10.1210/endo.142.11.8474.
30. Chan O, Inouye K, Akirav E, Park E, Riddell MC, Vranic M, Matthews SG. Insulin alone increases hypothalamo-pituitary-adrenal activity, and diabetes lowers peak stress responses. *Endocrinology.* 2005 Mar;146(3):1382-90. doi: 10.1210/en.2004-0607. Epub 2004 Nov 24.
31. Коваленко ВН, Талаєва ТВ, Братусь ВВ. Серцево-судинні захворювання і ренин-ангіотензинова система. К.: Моріон. 2013. 232 с. (Kovalenko VN, Talayeva TV, Bratus VV. Cardiovascular diseases and renin-angiotensin system. K.: Morion. 2013. 232 p.).

## The effect of dapagliflozin on the activity of angiotensin-converting enzyme in the structures of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system and the function of the adrenal cortex in rats with type 2 diabetes

L.M. Kalynska, O.I. Kovzun

SI «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»

**Abstract. The aim** of the study was to investigate the effect of the Sodium-Dependent Glucose Cotransporter 2 (SGLT2) Inhibitor dapagliflozin on the activity of angiotensin-converting enzyme (ACE) in the centers regulating the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system (HPAS), as well as the level of corticosteroids and ACE activity in the serum of rats with type 2 diabetes (T2D). **Material and methods.** T2D was modeled using a high-calorie diet and injections of low doses of streptozotocin (15 and 25 mg/kg) in intact male rats. A suspension of dapagliflozin (DGF) was administered to rats with T2D per os at a dose of 1 mg/kg once a day for 8 days. ACE activity in the hypothalamus, adenohypophysis, adrenal glands, and serum of rats was determined by a fluorimetric method using Benzoyl-Gly-His-Leu as a substrate («Sigma», USA). The content of 11-hydroxycorticosteroids (11-OHCS) in the serum of rats was measured using a fluorimetric micromethod. **Results.** It was shown that in rats at the early stage of T2D (2 weeks after finding impaired glucose tolerance and increased basal glycemia level) ACE activity in the structures of HPAS — the hypothalamus, adenohypophysis, adrenal glands and serum does not differ from the enzyme activity in control. A significant increase in the level of protein and peptide

## Оригінальні дослідження

substances was revealed in the neurohypophysis of rats with two-week T2D in contrast to the structures of HPAS. Elevated level of 11-OHCS was detected in the serum of rats with T2D. According to the obtained data, multiple administration of DGF to diabetic rats for 8 days leads to a decrease in ACE activity and the level of 11-OHCS in the serum of animals with T2D. In the adrenal glands of these animals, ACE activity tends to decrease. Studies of the effect of the administration of DGF in the central links of HPAS revealed a significant increase in ACE activity in the adenohypophysis of rats with T2D. **Conclusions.** At an early stage of T2D development, ACE is not involved in HPAS dysfunction, — changes in enzyme activity in the hypothalamus, adenohypophysis, adrenal glands were not detected. Increased level of protein and peptide substances in the neurohypophysis of rats with T2D at the early stages indicates increased biosynthesis of neuropeptide hormones, in particular oxytocin and vasopressin. The consequence of the direct action of which is obviously an increase in the secretory activity of the adrenal segment in HPAS, namely the level of corticosteroids, found in our experiments. Decreased activity of circulating form of serum ACE and corticosteroid level in rats with diabetes after 8 days of administration of the SGLT2 inhibitor, dapagliflozin, may be the important factors which provide a decrease in insulin resistance, the formation of which is enhanced by the angiotensin system, and also provide a decrease in arterial blood pressure, that positively affect the function of the kidneys and the circulatory system.

**Keywords:** Angiotensin-converting enzyme, hypothalamic-pituitary-adrenocortical system, dapagliflozin, corticosteroids.

## Влияние дапаглифлозина на активность ангиотензин-превращающего фермента в структурах гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы и функцию коры надпочечников крыс с сахарным диабетом 2-го типа

Л.Н. Калининская, Е.И. Ковзун

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины»

**Резюме.** Цель работы — исследовать влияние ингибитора натрийзависимого котранспортера глюкозы 2 (НЗКТГ2) — дапаглифлозина на активность ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) в центрах регуляции гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГГАС), а также уровень кортикостероидов и активность АПФ в сыворотке крови крыс с сахарным диабетом 2-го типа (СД2). **Материал и методы.** СД2 моделировали с помощью высококалорийной диеты и инъекций низких доз стрептозотоцина (15 и 25 мг/кг) у интактных крыс самцов. Суспензию дапаглифлозина (ДГФ) вводили крысам с СД2 *per os* в дозе 1 мг/кг один раз в сутки в течение 8 суток. Активность АПФ в гипоталамусе, гипофизе, надпочечных железах и сыворотке крови крыс определяли с помощью флюориметрического ме-

тода, используя как субстрат Benzoyl-Gly-His-Leu («Sigma», США). Содержание 11-гидроксикортикостероидов (11-ОКС) в сыворотке крови крыс устанавливали с помощью флюориметрического микрометода. **Результаты.** Показано, что у крыс на ранней стадии развития СД 2 (через 2 недели после констатации нарушения толерантности к глюкозе и повышения уровня базальной гликемии) активность АПФ в структурах ГГАС — гипоталамусе, аденогипофизе, надпочечниках и сыворотке крови не отличается от активности фермента в контроле. В нейрогипофизе крыс с двухнедельным СД2 в отличие от структур ГГАС выявлено существенное повышение уровня белковых и пептидных веществ. В сыворотке крови крыс с СД2 выявлено повышение уровня 11-ОКС. Введение ДГФ на протяжении 8 дней приводит к снижению активности АПФ и уровня 11-ОКС в сыворотке крови крыс с СД2. В надпочечниках этих животных установлена тенденция к снижению активности АПФ. Исследования эффекта введения ДГФ в центральных звеньях ГГАС показали значительное повышение активности АПФ в аденогипофизе крыс с СД2. **Выводы.** На ранней стадии развития СД2 АПФ не принимает участие в процессах нарушения функции ГГАС — изменений активности фермента в гипоталамусе, аденогипофизе и надпочечниках не выявлено. Повышение уровня белковых и пептидных веществ в нейрогипофизе крыс на ранней стадии СД2 свидетельствует об усилении биосинтеза нанопептидных гормонов, в частности окситоцина и вазопрессина. Следствием прямого действия этих гормонов, очевидно, является установленное нами повышение секреторной активности надпочечникового звена ГГАС, в частности уровня кортикостероидов. Снижение активности сывороточного АПФ и снижение уровня кортикостероидов после 8-дневного введения ингибитора ДГФ крысам с СД2 могут быть важными факторами, которые обеспечивают снижение инсулинорезистентности, формирование которой усиливает ангиотензиновая система, а также способствуют снижению артериального давления, что оказывает позитивное влияние на функции почек и систему кровообращения.

**Ключевые слова:** ангиотензин-превращающий фермент, гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальная система, дапаглифлозин, кортикостероиды.

**Для цитирования:** Калининская ЛМ, Ковзун ОI. Влияние дапаглифлозина на активность ангиотензин-превращающего фермента в структурах гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы та функцию коры надпочечников крыс с сахарным диабетом 2-го типа. Эндокринология. 2021;26(4):357-365. DOI: 10.31793/1680-1466.2021.26-4.357.

**Адреса для листування:** Калининская Людмила Николаевна, Liudmylakalynska@gmail.com ДУ «Институт эндокринологии та обміну речовин ім. В.П. Комиссаренка НАМН України», вул. Вишгородська, 69, Київ 04114, Україна.

**Відомості про авторів:** Калининская Людмила Николаевна, д-р біол. наук, старш. співроб., головний науковий співробітник відділу фундаментальних і прикладних проблем ендокринології, ORCID: 0000-0002-6689-0507; Ковзун Олена Ігорівна, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАМН України, заступник директора Інституту з наукової роботи, ORCID: 0000-0001-8164-7671.

**Особистий внесок:** Калинська Л.М. — аналіз літературних джерел, проведення біохімічних досліджень, аналіз результатів і написання тексту; Ковзун О.І. — ідея роботи й консультація під час редагування статті.

**Фінансування:** стаття підготовлена в рамках бюджетного фінансування Національної академії медичних наук України.

**Декларація з етики:** автори задекларували відсутність конфлікту інтересів і фінансових зобов'язань.

**Стаття:** надійшла до редакції 11.11.2021 р.; перероблена 08.12.2021 р.; прийнята до друку 15.12.2021 р.; надрукована 28.12.2021 р.

**For citation:** Kalynska LM, Kovzun OI. The effect of dapagliflozin on the activity of angiotensin-converting enzyme in the structures of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system and the function of the adrenal cortex in rats with type 2 diabetes. *Endokrynologia*. 2021;26(4):357-365. DOI: 10.31793/1680-1466.2021.26-4.357.

**Correspondence address:** Kalynska Liudmyla Mykolaivna, Liudmylakalynska@gmail.com, State Institution «VP Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Vyshgorodskaya str., 69, Kyiv 04114, Ukraine.

**Information about the authors:** Kalynska Liudmyla Mykolaivna, Dr. Sci. (Biology), Senior Scientist, Chief Research Fellow of the Department of Fundamental and Applied Problems of Endocrinology, ORCID; 0000-0002-6689-0507; Kovzun Olena Igorivna, Dr. Sci. (Biology), Prof., Cor. Member of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Deputy Director of the Institute of Scientific Affairs, ORCID; 0000-0001-8164-7671.

**Personal contribution:** Kalynska LM. — analysis of literary sources and text writing; Kovzun OI. — idea of work and consultation when editing an article.

**Funding:** the article was prepared within the budgeted funding of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine.

**Declaration of ethics:** authors have declared no conflict of interest and financial obligations.

**Article:** received 11 November 2021; revised 08 December 2021; accepted for publication 15 December 2021; published 28 December 2021.

**Для цитування:** Калинская ЛН, Ковзун ЕИ. Влияние дапаглифлозина на активность ангиотензин-превращающего фермента в структурах гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы и функцию коры надпочечниковых желез у крыс с сахарным диабетом 2-го типа. *Эндокринология*. 2021;26(4):357-365. DOI: 10.31793/1680-1466.2021.26-4.357.

**Адрес для переписки:** Калинская Людмила Николаевна, Liudmylakalynska@gmail.com ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины», ул. Вышгородская, 69, Киев 04114, Украина.

**Сведения об авторах:** Калинская Людмила Николаевна, д-р биол. наук, старш. науч. сотруд., главный научный сотрудник отдела фундаментальных и прикладных проблем эндокринологии, ORCID: 0000-0002-6689-0507; Ковзун Елена Игоревна, д-р биол. наук, проф., чл.-кор. НАМН Украины, заместитель директора Института по научным вопросам, ORCID: 0000-0001-8164-7671.

**Личный вклад:** Калинская Л.Н. — анализ литературных источников, проведение биохимических исследований, анализ результатов и написание текста; Ковзун Е.И. — идея статьи и консультация при редактировании статьи.

**Финансирование:** статья подготовлена в рамках бюджетного финансирования Национальной академии медицинских наук Украины.

**Декларация по этике:** авторы задекларировали отсутствие конфликта интересов и финансовых обязательств.

**Статья:** поступила в редакцию 11.11.2021 р.; переработана 08.12.2021 р.; принята в печать 15.12.2021 р.; напечатана 28.12.2021 р.