БИОХИМИЯ, 2021, том 86, вып. 2, с. 214 – 227

УДК 615.31+616.43

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ НАГРУЖЕННЫХ ПОЛИДАТИНОМ ХИТОЗАНОВЫХ НАНОЧАСТИЦ У КРЫС С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ: МОДУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА ГЛЮКОЗЫ, ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И БИОМАРКЕРОВ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ*

© 2021 А.М. Абд Эль-Хамид[1], А.И. Юсеф[2], С.М. Абд Эль-Тваб[2], А.А.Г. Эль-Шахави[3], А. Абдель-Монеим[2]**

[1] *Chemistry Department, Faculty of Science, Taibah University, 30002 Al-Madinah Al-Munawarah, Saudi Arabia*

[2] *Molecular Physiology Division, Faculty of Science, Beni-Suef University, 62511 Beni-Suef, Egypt; E-mail: adel.hassan@science.bsu.edu.eg*

[3] *Materials Science and Nanotechnology Department, Faculty of Postgraduate Studies for Advanced Sciences (PSAS), Beni-Suef University, 62511 Beni-Suef, Egypt*

Поступила в редакцию15.06.2020
После доработки 03.09.2020
Принята к публикации 09.09.2020

Полидатин (PD – polydatin) обладает широким набором фармакологической активности, однако его действие при диабетическом поражении печени изучено мало. Целью настоящей работы было исследование возможности защитного эффекта хитозановых наночастиц, нагруженных полидатином (PD-CSNPs – polydatin-loaded chitosan nanoparticles), или свободным полидатином при поражениях печени, ассоциированных с диабетом. Диабет у крыс индуцировали при помощи никотинамида и стрептозоцина. Животные были разделены на шесть групп: нормальный контроль, диабетический контроль, а также крысы, получавшие перорально ежедневно в течение 4-х недель полидатин, хитозановые наночастицы с полидатином, ненагруженные хитозановые наночастицы или метформин. Добавление в пищу полидатина и нагруженных полидатином хитозановых наночастиц вызывало существенное снижение уровня глюкозы в крови и перекисного окисления липидов в печени, снижение активности трансаминаз и ферментов метаболизма углеводов в сыворотке крови, в том числе сукцинатдегидрогеназы и пируваткиназы. В то же время в печени, напротив, наблюдалось повышение уровня гликогена и глутатиона, а также активность антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, каталаза и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, в сравнении с контрольными диабетическими крысами. Кроме того, значительно снижалась экспрессия мРНК фактора некроза опухолей α и интерлейкина 1β, в то время как уровни мРНК транспортера глюкозы 2 и глюкокиназы значительно повышались по сравнению с диабетическим контролем. На основании полученных результатов мы заключили, что PD-CSNPs и PD оказывали положительное воздействие при диабетическом поражении печени путем модуляции экспрессии транспортера глюкозы 2, влияющей на активность ферментов метаболизма углеводов, а также подавляли окислительный стресс и воспаление. Было показано, что PD-CSNPs являются более эффективным препаратом по сравнению со свободным PD, вероятно, благодаря более высокой биодоступности и пролонгированному высвобождению PD из наночастиц.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: диабетическое поражение печени, нагруженные полидатином хитозановые наночастицы, ферменты метаболизма углеводов, транспортер глюкозы 2, окислительный стресс.

DOI: 10.31857/S0320972521020068

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода (reactive oxygen species); CAT – каталаза (catalase); DM – сахарный диабет (diabetes mellitus); G6PD – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (glucose-6-phosphate dehydrogenase); GK – глюкокиназа (glucokinase); GLUT2 – транспортер глюкозы 2 (glucose transporter 2); GPX – глутатионпероксидаза (glutathione peroxidase); GSH – восстановленный глутатион (reduced glutathione); IL-1β – интерлейкин 1β (interleukin 1β); LPO – перекисное окисление липидов (lipid peroxidation); MDA – малоновый диальдегид (malondialdehyde); NA – никотинамид (nicotinamide); PD – полидатин (polydatin); PD-CSNPs – нагруженные полидатином хитозановые наночастицы (polydatin-loaded chitosan nanoparticles); PK – пируваткиназа (pyruvate kinase); SDH – сукцинатдегидрогеназа (succinate dehydrogenase); SOD – супероксиддисмутаза (superoxide dismutase); STZ – стрептозотоцин (streptozotocin); TNF-α – фактор некроза опухолей α (tumor necrosis factor α), TP – общий белок (total protein).

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM20-162, 02.11.2020.

** Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет (DM – diabetes mellitus) является комплексной, распространенной и серьезной проблемой, касающейся здоровья человека. Это заболевание характеризуется хронической гипергликемией, которая является результатом дефицита инсулина и/или эффектов такого дефицита [1]. Сахарный диабет ассоциирован с нарушением функций и поражениями различных органов, которые в конечном итоге приводят ко многим опасным для здоровья осложнениям и высокой заболеваемости и смертности среди больных диабетом [1, 2]. В печени, которая является одним из основных поражаемых органов, сахарный диабет вызывает долговременные метаболические дисфункции, приводящие к поражению тканей и способствующие прогрессированию различных заболеваний, таких как неалкогольная жировая болезнь печени, цирроз и гепатоцеллюлярная карцинома [3]. Среди больных диабетом широко распространено поражение печени; в частности, у 75% больных диабетом 2-го типа диагностирована неалкогольная жировая болезнь печени [4].

Неконтролируемая гипергликемия, ассоциированная с сахарным диабетом, вызывает окислительные повреждения, способствует инициации воспалительных процессов и приводит к возникновению и прогрессированию заболеваний печени [5]. Lucchesi et al. [6] показали, что гипергликемия приводит к окислительному стрессу в клетках печени, который проявляется повышением уровня активных форм кислорода (АФК) и снижением экспрессии антиоксидантных маркеров. Большое количество АФК может продуцироваться в ходе окислительного фосфорилирования в митохондриях или другими путями, такими как аутоокисление глюкозы, неферментативное гликирование, активация протеинкиназы C (абб. PKC от англ. protein kinase C), а также метаболические пути гексозамина и сорбитола [5, 7]. Воспаление может также быть важным механизмом поражения печени у больных диабетом. В диабетическом состоянии происходит повышение экспрессии фактора некроза опухолей α (абб. TNF-α от англ. tumor necrosis factor α) и его рецептора TNF-R1, что способствует повышению экспрессии индуцибельной синтазы оксида азота (абб. iNOS от англ. inducible nitric oxide synthase) и продукции в печени оксида азота [8]. Такое повышение уровня провоспалительных цитокинов усиливает негативные эффекты глюкозотоксичности и приводит к дисфункции митохондрий, окислительному стрессу и поражению печени [3, 8].

В последние десятилетия большое внимание было уделено поиску альтернативных методов лечения диабета и связанных с ним осложнений, разработке эффективных и безопасных методов лечения на основе растительных препаратов [9]. Полидатин (абб. PD от англ. polydatin), также известный как пицеид (pieceid; 3,4′,5-тригидроксистильбен-3-β-D-глюкозид), был первоначально выделен из корней и корневищ травы *Polygonum cuspidatum*, произрастающей в Китае, которая традиционно используется при лечении лихорадки, боли, кашля и гипертензии. Также было показано, что PD может использоваться как мощный агент детоксикации при холестатическом поражении печени [10]. Антиоксидантное действие полидатина осуществляется путем регулирования продукции АФК и функционирования митохондрий; противовоспалительное действие PD состоит в снижении продукции провоспалительных цитокинов [11]. Применение полидатина в клинической практике ограничено, несмотря на его многообещающие фармакологические характеристики, ввиду низкой биодоступности в связи с его химической нестабильностью в водной среде при щелочных значениях pH, плохой растворимости в воде и значительного пресистемного метаболизма [12]. Несколько исследовательских групп работают над решением этой проблемы путем разработки систем доставки лекарств, которые могли бы защитить полидатин от деградации, повысить растворимость загруженного вещества в водных растворах, обеспечить направленную доставку лекарства к возможным мишеням и паттерны непрерывного высвобождения [13]. Целью настоящего исследования было изучение вероятного положительного эффекта нагруженных полидатином хитозановых наночастиц (PD-CSNPs) и свободного полидатина при поражении печени, ассоциированном с диабетом, с акцентом на модуляцию активности ферментов метаболизма углеводов и экспрессию транспортера глюкозы GLUT2, а также окислительный стресс и экспрессию провоспалительных маркеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты и реагенты. Полидатин, никотинамид (NA) и стрептозотоцин (STZ) были приобретены в «Sigma-Aldrich» (США). Метформин (MET) был получен в «Merck KGaA» (Германия). Хитозановые наночастицы с полидатином (PD-CSNPs) были синтезированы с помощью модифицированного метода ионного гелеобразования [14] и охарактеризованы по ранее опи-

санной Abdel-Moneim et al. методике [15]. Остальные реагенты и материалы были приобретены у стандартных коммерческих поставщиков.

Лабораторные животные. Крысы-самцы породы Wistar albino (весом 120–140 г) были приобретены в компании «VACSERA» (Египет). Животные содержались в хорошо проветриваемых клетках при нормальных атмосферных условиях с нормальным 12-часовым световым циклом свет/темнота. Работа с экспериментальными животными осуществлялась в соответствии с требованиями Институционального комитета по содержанию и использованию лабораторных животных (IACUC) Университета Бени-Суэфа (номер разрешения от IACUC: BSU-FS-2018-8).

Моделирование диабета с использованием никотинамида и стрептозотоцина (NA/STZ) у крыс. Стрептозотоцин (50 мг/кг массы тела) растворяли в холодном цитратном буфере (pH 4,5) и немедленно интраперитонеально вводили раствор крысам, голодавшим в течение ночи, спустя 15 мин после интраперитонеальной инъекции раствора никотинамида (110 мг/кг массы тела), приготовленного в нормальном физиологическом растворе [16]. Спустя неделю после инъекции отбирали крыс для дальнейшей работы – с уровнем глюкозы в крови натощак (абб. FBG от англ. fasting blood glucose) ≥ 200 мг/дл.

Схема эксперимента. Животные были разделены на шесть групп (по 6 особей в каждой группе): нормальные контрольные крысы, контрольные крысы с диабетом (D), крысы с диабетом, получавшие полидатин (D + PD, 50 мг/кг массы тела), крысы с диабетом, получавшие нагруженные полидатином хитозановые наночастицы (D + PD-CSNPs, в количестве, эквивалентном PD 50 мг/кг массы тела), крысы с диабетом, которые получали эквивалентное количество хитозановых наночастиц без полидатина (D + CSNPs), и крысы с диабетом, которые получали перорально метформин – стандартный агент, вызывающий гипогликемию (D + MET, 100 мг/кг массы тела). Все препараты вводили крысам ежедневно с помощью желудочного зонда; размер дозы пересчитывали каждую неделю в соответствии с изменениями веса животного.

Биохимический анализ. За день до умерщвления (после 4-х недель эксперимента) из латеральной хвостовой вены голодавших в течение ночи (8–10 ч) крыс производили забор крови. Выделенная сыворотка крови была использована для спектрофотометрического определения содержания глюкозы с использованием набора компании «Spinreact» (Испания). Содержание гликогена в печени определяли по методу Seifter et al. [17].

Активность аспартаттрансаминазы (AST) и аланинтрансаминазы (ALT) в сыворотке крови определяли с помощью наборов «Biosystems Company» (Испания). Колориметрическое определение активности сукцинатдегидрогеназы (SDH) и пируваткиназы (PK) в сыворотке крови проводили с помощью наборов «BioVision» (США). Общую концентрацию белка (абб. TP от англ. total protein) и концентрацию альбумина определяли с помощью наборов от «Spinreact» (Испания) и «HUMAN» (Германия) соответственно, согласно инструкции производителя.

Ткань печени гомогенизировали (10%) в нормальном физиологическом растворе. Супернатант получали в результате центрифугирования гомогената при 3000 об/мин в течение 10 мин. Гомогенат печени использовали для определения уровня перекисного окисления липидов (LPO) (анализ уровня малонового диальдегида MDA), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G6PD), восстановленного глутатиона (GSH), а также определения активности супероксиддисмутазы (SOD), каталазы (CAT) и глутатионпероксидазы (GPx) с помощью специальных наборов «Biodiagnostic» (Египет) в соответствии с инструкциями производителя.

Количественная ПЦР. Препарат тотальной РНК из ткани печени получали с помощью набора для экстракции компании «Qiagen» (США) в соответствии с инструкциями производителя. Чистоту выделенной РНК (по соотношению A260/A280) и её концентрацию определяли с помощью двухволнового спектрофотометра («Beckman», США). Тотальную РНК (0,5–2 мкг) использовали для получения кДНК с помощью набора обратной транскрипции «High-capacity cDNA reverse transcription kit» («Fermentas», США) согласно протоколу производителя. Количественную ПЦР в реальном времени и анализ продуктов реакции проводили с использованием системы StepOne Real-Time PCR («Applied Biosystems», США) с соответствующим программным обеспечением, версия 3.1. Температура отжига праймеров была оптимизирована под использованные наборы праймеров (табл. 1). Количественное определение проводили с использованием программного обеспечения «Applied Biosystems» методом ΔΔCt. Значение RQ представляет собой кратность изменения по сравнению с нормальным контролем.

Гистологические исследования. Для проведения гистологического анализа брали по пять животных из каждой группы. Вкратце, небольшой кусочек печени фиксировали в 10%-ном формалине при нейтральных значениях pH в течение 24 ч. Ткань обезвоживали растворами этанола с повышающимися концентрациями (70%,

Таблица 1. Пары праймеров, использованные для проведения количественной ПЦР в реальном времени

Ген	Прямой праймер (5′→3′)	Обратный праймер (5′→3′)
β-актин	TGTTTGAGACCTTCAACACC	CGCTCATTGCCGATAGTGAT
GK	CAACTGGACCAAGGGCTTCAA	TGTGGCCACCGTGTCATTC
GLUT2	CTGGAGCCCTCTTGATGGGA	CCAGTCCTGAAATTAGCCCACA
IL-1β	TGATGTCCCATTAGACAGC	GAGGTGCTGATGTACCAGTT
TNF-α	GCGACGTGGAACTGGCAGAAG	GGTACAACCCATCGGCTGGCA

Примечание. GK – глюкокиназа; GLUT2 – транспортер глюкозы 2; IL-1β – интерлейкин 1β; TNF-α – фактор некроза опухолей α.

95% и 100%), погружали в парафин, с помощью микротома делали срезы толщиной 4–5 мкм и проводили окрашивание гематоксилином и эозином. С помощью светового микроскопа исследовали каждый препарат в пяти полях зрения [18].

Статистическая обработка результатов. Полученные данные анализировали с помощью программы SPSS, version 20 for Windows («SPSS Inc.», США). Для сравнения экспериментальных групп использовали метод однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и затем метод группирования выборок с наименее значимой разницей для множественных сравнений. Различия считали достоверными при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние PD и PD-CSNPs на метаболизм углеводов. Одним из прямых проявлений нарушения гомеостаза углеводов является изменение активности ферментов метаболизма углеводов. На рис. 1 показано, что применение препаратов PD и PD-CSNPs снижало уровень FBG ($p < 0,001$), в то время как активность SDH и PK в сыворотке крови заметно повышалась по сравнению с контрольными диабетическими крысами. Применение PD и PD-CSNPs также вызывало повышение содержания гликогена в печени ($p < 0,001$). При этом препарат PD-CSNPs вызывал более выраженный эффект в сравнении со свободным полидатином. Эффективность действия PD и PD-CSNPs была сравнима с положительным эффектом метформина в сравнении с диабетическими контрольными крысами (рис. 1).

Влияние PD и PD-CSNPs на активность трансаминаз и белковый профиль. Повышение активности AST и ALT в сыворотке крови является стандартным биохимическим маркером поражения печени. Мы выявили повышение активности и AST, и ALT в сыворотке крови диабетических крыс по сравнению с нормальными контрольными крысами ($p < 0,001$). Применение PD или PD-CSNPs вызывало значительное снижение активности AST и ALT у этих крыс. Общая концентрация белка у крыс в диабетической группе была значительно снижена по сравнению с нормальным контролем ($p < 0,01$), но была значительно выше в группе крыс, получающих метформин, по сравнению с контрольными диабетическими крысами ($p < 0,05$). Концентрация сывороточного альбумина была также существенно снижена по сравнению с нормальной контрольной группой ($p < 0,01$), но значительно возрастала ($p < 0,05$) после применения PD-CSNPs или метформина (рис. 2).

Влияние PD и PD-CSNPs на окислительный стресс и антиоксидантные маркеры в печени. В сравнении с нормальными контрольными крысами было обнаружено заметное повышение ($p < 0,001$) уровня малонового диальдегида (маркера перекисного окисления липидов) у диабетических крыс. Также наблюдалось заметное снижение ($p < 0,05$) активности SOD, CAT, GPx, G6PD и уровня GSH в диабетической группе по сравнению с нормальной контрольной группой. Как и предполагалось, применение PD и PD-CSNPs вызывало повышение уровня GSH и активности SOD, GPx, CAT и G6PD параллельно со снижением продукции MDA по сравнению с диабетическими контрольными крысами. Таким образом, применение PD, PD-CSNPs и MET может значительно снизить окислительный стресс и повысить экспрессию антиоксидантных маркеров в ткани печени крыс, страдающих диабетом (табл. 2).

Влияние PD и PD-CSNPs на экспрессию GLUT2, IL-1β, TNF-α и глюкокиназы (GK). В печени контрольных крыс с диабетом экспрессия мРНК GLUT2 и GK была снижена в сравнении с нормальной контрольной группой ($p < 0,001$). Применение PD или PD-CSNPs повышало

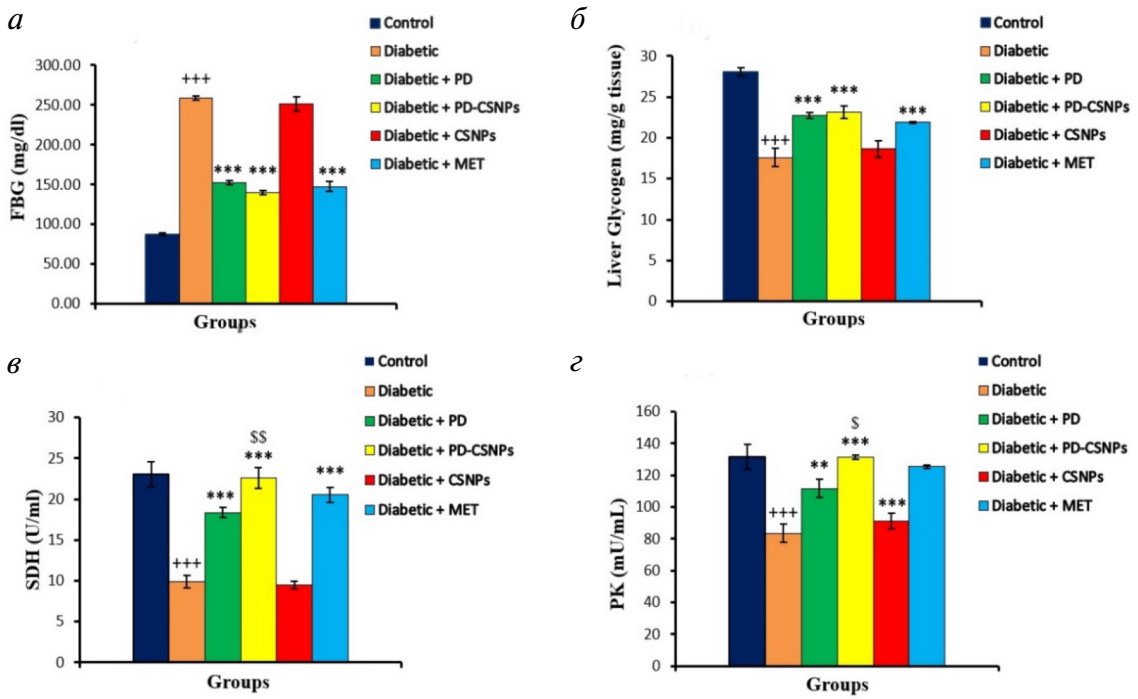

Рис. 1. Влияние PD и PD-CSNPs на уровень глюкозы натощак в сыворотке крови (*а*), гликогена в печени (*б*) и активность ключевых ферментов метаболизма углеводов, SDH (*в*) и PK (*г*). Результаты представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка. +++, $p < 0{,}001$ в сравнении с нормальной контрольной группой; **, $p < 0{,}01$; ***, $p < 0{,}001$ в сравнении с диабетической контрольной группой; $, $p < 0{,}05$; $$, $p < 0{,}01$ в сравнении с диабетическими крысами, получавшими полидатин (Diabetic + PD). (С цветными вариантами рис. 1–5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/.)

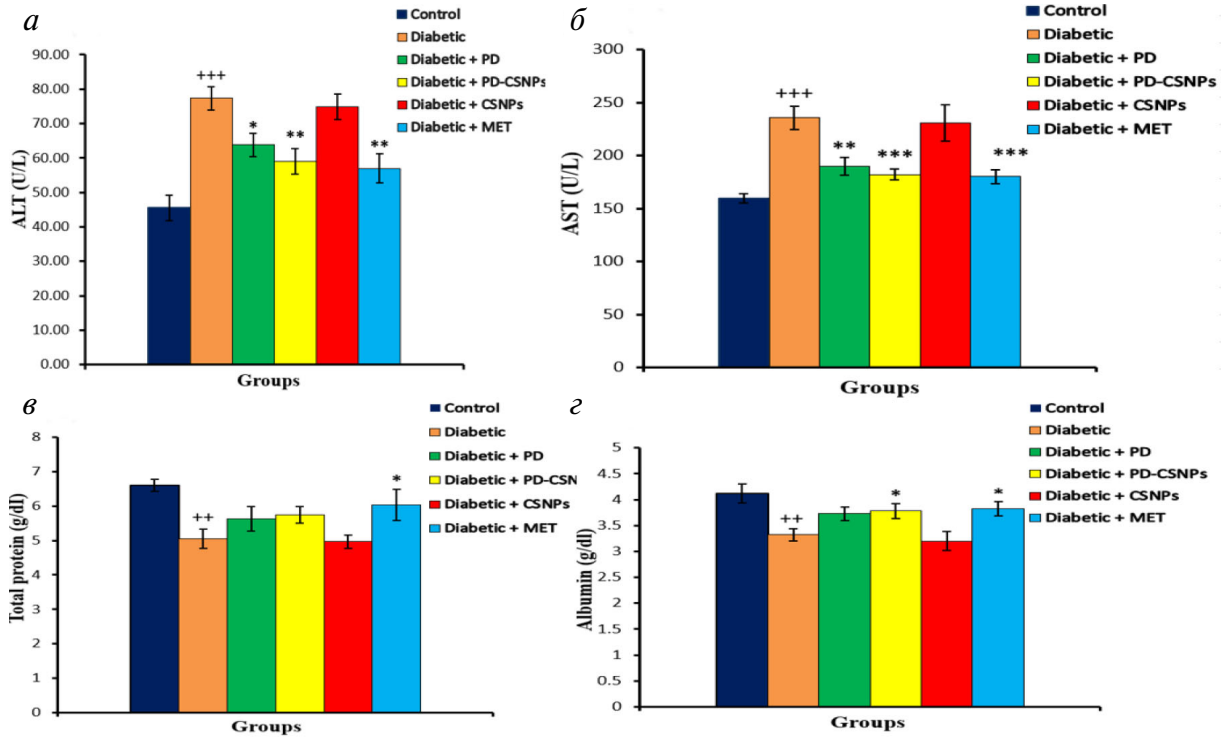

Рис. 2. Влияние PD и PD-CSNPs на ферменты печени (*а* – ALT, *б* – AST) и белковый профиль у диабетических крыс (*в* – общий белок, *г* – альбумин). Результаты представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка. ++, $p < 0{,}01$; +++, $p < 0{,}001$ в сравнении с нормальной контрольной группой; *, $p < 0{,}05$; **, $p < 0{,}01$; ***, $p < 0{,}001$ в сравнении с диабетической контрольной группой

Таблица 2. Влияние PD и PD-CSNPs на окислительный стресс и антиоксидантные маркеры в печени диабетических крыс

Параметр / Группа	LPO (нмоль MDA/100 мг ткани)	SOD (Ед/г ткани)	CAT ($K \times 10^{-2}$)	GSH (нмоль/100 мг ткани)	GPx (мЕд/100 мг ткани)	G6PD (мЕд/мл)
Контроль	23,33 ± 0,50	14,53 ± 0,68	97,50 ± 6,82	170,24 ± 25,78	112,03 ± 2,52	15,13 ± 1,21
Диабет	39,98 ± 2,85^{+++}	8,24 ± 0,49^{+++}	56,67 ± 4,75^{++}	105,60 ± 15,88^{++}	79,52 ± 6,04^{+++}	6,09 ± 0,34^{+++}
Диабет + PD	33,01 ± 0,93*	10,46 ± 0,58*	79,78 ± 2,55*	149,82 ± 9,58*	91,40 ± 2,00*	9,65 ± 0,20**
Диабет + PD-CSNPs	30,08 ± 1,16**	11,13 ± 0,43**	85,61 ± 5,47*	167,68 ± 7,85**	95,18 ± 2,80**	13,23 ± 0,73***$$
Диабет + CSNPs	38,42 ± 2,33	8,29 ± 0,53	65,30 ± 14,31	112,20 ± 14,36	83,50 ± 4,63	7,03 ± 0,28
Диабет + MET	33,16 ± 2,30*	11,02 ± 0,65**	81,86 ± 8,49*	158,63 ± 9,47*	91,53 ± 4,21*	11,49 ± 0,65***

Примечание. Результаты представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка. ++, $p < 0{,}01$ и +++, $p < 0{,}001$ в сравнении с нормальной контрольной группой; *, $p < 0{,}05$ и **, $p < 0{,}01$ в сравнении с диабетической контрольной группой; $$, $p < 0{,}01$ в сравнении с группой «Диабет + PD».

экспрессию GLUT2 и GK относительно группы диабетического контроля ($p < 0{,}001$). Следует отметить, что использование PD-CSNPs вызывало более выраженный положительный эффект по сравнению с группой, получавшей свободный полидатин ($p < 0{,}01$) (рис. 3).

Что касается воспалительных цитокинов, то было обнаружено повышение уровня мРНК TNF-α и IL-1β в ткани печени крыс из диабетической контрольной группы в сравнении с нормальной контрольной группой ($p < 0{,}001$). Применение PD или PD-CSNPs вызывало сниже-

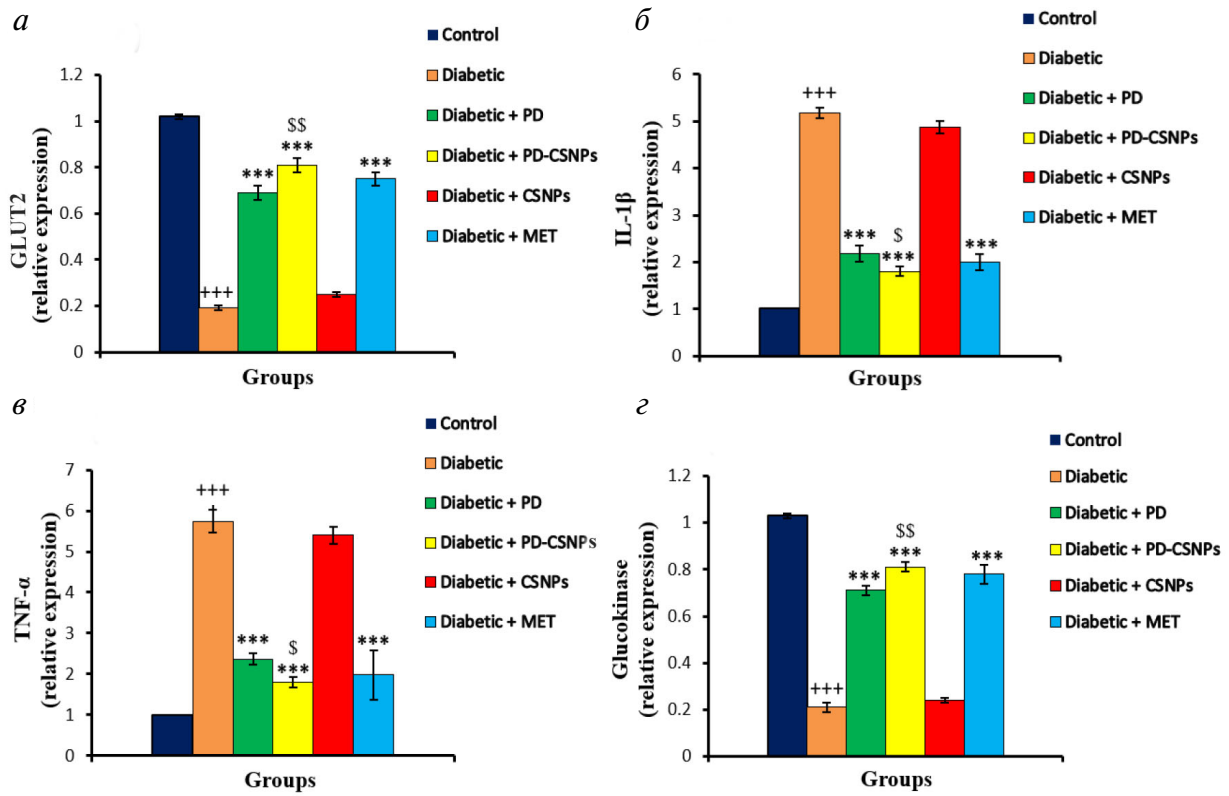

Рис. 3. Влияние PD и PD-CSNPs на экспрессию GLUT2 (*а*), IL-1β (*б*), TNF-α (*в*) и GK (*г*). Результаты представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка. +++, $p < 0{,}001$ по сравнению с нормальной контрольной группой; ***, $p < 0{,}001$ по сравнению с диабетической группой; $, $p < 0{,}05$ и $$, $p < 0{,}01$ по сравнению с диабетической группой, получавшей полидатин (Diabetic + PD)

ние экспрессии TNF-α по сравнению с диабетической контрольной группой ($p < 0,001$). Положительный эффект в группе PD-CSNPs был более значительным в сравнении с группой, получавшей свободный PD ($p < 0,05$). При этом применение и PD, и PD-CSNPs приводило к заметному улучшению по сравнению с использованием MET (рис. 3).

Влияние PD и PD-CSNPs на гистологию печени. Гистологическое исследование печени нормальных контрольных крыс показало типичную структуру с центральной веной, синусоидами и гепатоцитами (рис. 4, *а*). Срезы печени контрольных животных с диабетом показали значительные поражения в виде жировых изменений, расширенных гиперемированных синусоидов, вакуолярную дегенерацию гепатоцитов и наличие отдельных гепатоцитов с пикнотическими и кариолитическими ядрами (рис. 4, *б*). У диабетических крыс, получавших ненагруженные CSNPs, наблюдались жировые изменения, расширенные гиперемированные синусоиды, вакуолярная дегенерация гепатоцитов и отдельные гепатоциты с пикнотическими и кариолитическими ядрами (рис. 4, *в*). В то же время применение PD-CSNPs вызывало заметные улучшения в большей части печени (рис. 4, *г*). Использование PD-CSNPs инициировало более выраженный защитный эффект против индуцируемых диабетом гистологических аномалий в печени по сравнению с применением свободного PD (рис. 4, *д*). Как и ожидалось, MET также способствовал улучшению состояния ткани печени (рис. 4, *е*).

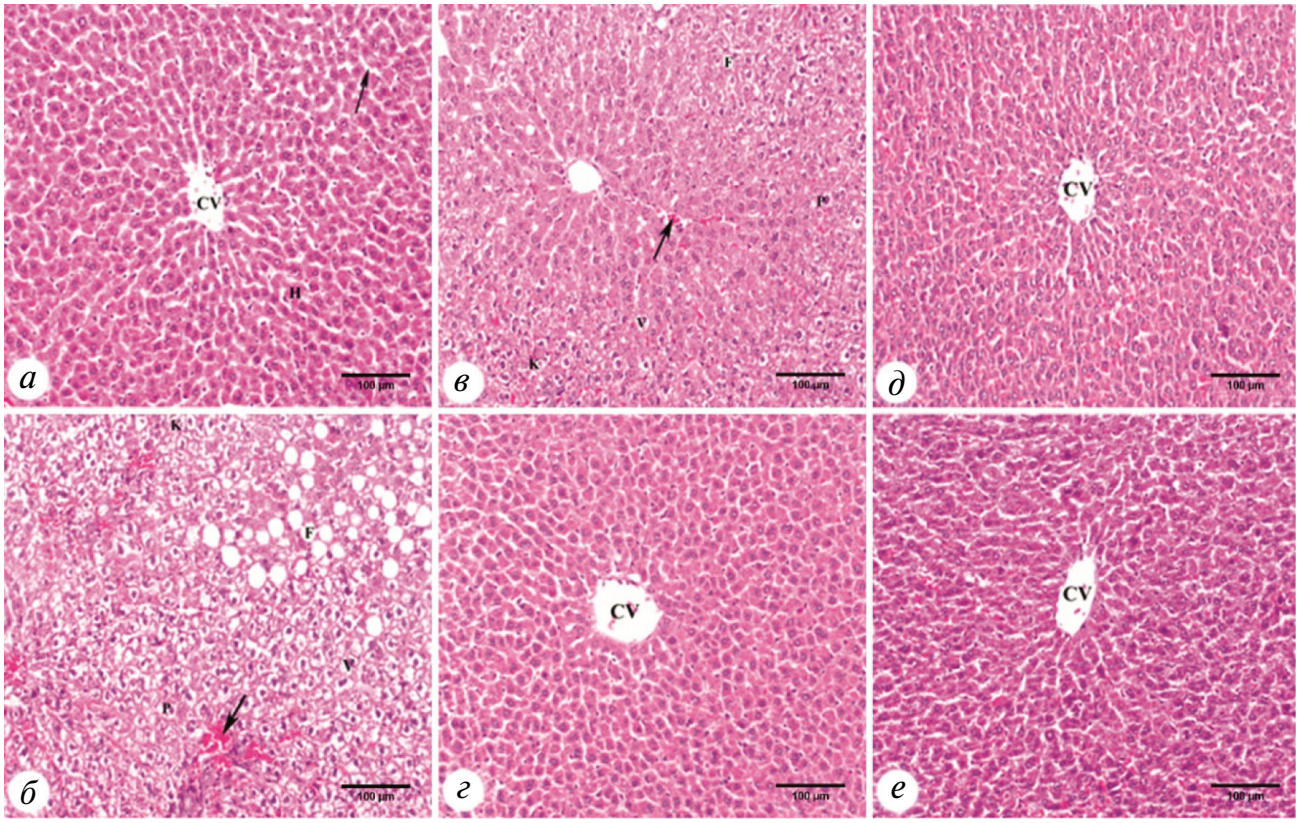

Рис. 4. Микрофотографии срезов печени, окрашенных гематоксилином и эозином: *а* – контрольные нормальные крысы, у которых наблюдается нормальная структура с центральной веной (CV – central vein), синусоидами (стрелка) и гепатоцитами (H); *б* – контрольные животные с диабетом, у которых наблюдаются жировые изменения (F), расширенные гиперемированные синусоиды (стрелка), вакуолярная дегенерация гепатоцитов (V) и отдельные гепатоциты с пикнотическими (P) и кариолитическими (K) ядрами; *в* – диабетические крысы, получавшие ненагруженные хитозановые наночастицы, у которых наблюдаются жировые изменения (F), расширенные гиперемированные синусоиды (стрелка), вакуолярная дегенерация гепатоцитов (V) и отдельные гепатоциты с пикнотическими (P) и кариолитическими (K) ядрами; *г* – диабетические крысы, которые получали нагруженные полидатином хитозановые наночастицы, у которых наблюдается заметное улучшение в ткани печени с центральной веной (CV); *д* – диабетические крысы, получавшие полидатин, показана центральная вена (CV) и умеренно выраженные улучшения в большинстве гепатоцитов; *е* – диабетическая группа животных, которые получали MET-HCl, зафиксировано улучшение состояния большинства гепатоцитов и центральной вены (CV). Единица шкалы – 100 мкм

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Печень является одним из главных органов, испытывающих воздействие хронических метаболических нарушений, ассоциированных с диабетом, которые в конечном итоге вызывают поражение печени и прогрессирование многих заболеваний, таких как неалкогольная жировая болезнь печени, цирроз и гепатоцеллюлярная карцинома [3]. Полидатин, биологически активное вещество растительного происхождения, обладает многими полезными с точки зрения терапии свойствами, включая антиоксидантную и противовоспалительную активность [11], что делает его хорошим кандидатом для смягчения поражения печени у больных диабетом. В настоящей работе показано, что пероральное введение свободного полидатина и нагруженных полидатином хитозановых наночастиц в течение 4-х недель после индукции диабета приводило к смягчению поражения печени у диабетических крыс.

Эффекты PD и PD-CSNPs как потенциальных гипогликемических агентов у крыс с диабетом оказались сходны с действием MET. Метформин может снижать уровень глюкозы в крови путем повышения чувствительности к инсулину и ускорения усвоения глюкозы [19]. Антигипергликемический эффект PD и PD-CSNPs у диабетических крыс подтверждается снижением уровня FBG в сравнении с контрольными диабетическими крысами. Ранее мы показали, что применение PD и PD-CSNPs способствовало нормализации уровня инсулина и заметному снижению уровня гликированного гемоглобина (HbA1c), а также параметров гомеостатической модели оценки резистентности к инсулину (абб. HOMA-IR от англ. homeostatic model assessment of insulin resistance) у получавших эти препараты крыс-диабетиков [15]. В сравнении с контрольными крысами, у крыс с диабетом наблюдался дефицит гликогена в печени, который значительно смягчался при применении PD и PD-CSNPs. В число факторов, приводящих к снижению содержания гликогена в печени крыс с диабетом, входит инсулиновая недостаточность, которая, в свою очередь, приводит к активации процессов глюконеогенеза и гликогенолиза [20]. Гликоген является основной внутриклеточной формой запасания глюкозы в печени, и его уровень является прямым свидетельством активности инсулина, т.к. инсулин стимулирует гликогенсинтазу и, соответственно, депонирование гликогена [21]. Эти результаты согласуются с данными Wang et al. [22], которые наблюдали повышение содержания гликогена в печени мышей с диабетом 2-го типа после введения им полидатина.

В случае диабета 2-го типа нечувствительность к глюкозе часто ассоциируется с нарушением функционирования транспортера глюкозы 2 (GLUT2) [23]. Глюкокиназа является физиологическим сенсором глюкозы в глюкозозависимых тканях, включая поджелудочную железу и печень [24]. В настоящей работе мы показали, что экспрессия мРНК GLUT2 и GK в печени крыс с диабетом была снижена. После введения крысам препаратов PD и PD-CSNPs происходило восстановление уровня мРНК GLUT2 и GK практически до нормальных значений, более выраженный эффект наблюдался в группе PD-CSNPs. GLUT2 является основной изоформой транспортера глюкозы в печени, где он участвует в транспорте глюкозы в обоих направлениях и, таким образом, играет ключевую роль в гомеостазе глюкозы [25]. Снижение уровня GLUT2 приводит к падению глюкозозависимой секреции инсулина из-за ограниченного количества глюкозы, поступающего в β-клетки поджелудочной железы [26], и может таким образом быть одной из причин гипергликемии. В печени в ответ на высокий уровень глюкозы в плазме крови GLUT2 транспортируется из цитоплазмы на плазматическую мембрану, где он служит в качестве основного переносчика глюкозы из плазмы в гепатоциты [27]. Утрата функций глюкокиназы, помимо нарушения метаболизма углеводов, также ассоциирована с гипергликемией или гипогликемией [28], и изменения уровня глюкозы в крови находятся под влиянием экспрессии GK в печени [29]. Следовательно, восстановление уровня GLUT2 повысит усвоение глюкозы и тем самым поможет бороться с гипергликемическими состояниями. Так, у страдающих ожирением и диабетом крыс Цукера экспрессия GK в печени снижается по мере усиления тяжести заболевания. У мышей гиперэкспрессия GK в печени способствовала нормализации уровня глюкозы, в то время как дефицит GK был ассоциирован с гипергликемией [30].

Гликолиз представляет собой единственный путь катаболизма глюкозы. Потребление глюкозы с пищей является необходимым для регуляции гликолитического пути в печени [31]. Пируваткиназа (PK) является одним из скорость-лимитирующих ферментов гликолиза, что также оказывает прямое влияние на скорость и направление всего метаболизма углеводов [32]. PK катализирует реакцию синтеза пирувата и ATP путем переноса фосфатной группы с фосфоенолпирувата на ADP [33], она ускоряет процесс усвоения глюкозы и способствует гликолизу. SDH участвует в процессах как гликолиза, так и цикла трикарбоновых кислот (абб. TCA от англ.

tricarboxylic acid cycle) [34]. Активация действия SDH в электрон-транспортной цепи и TCA могла бы способствовать усвоению глюкозы в печени [35]. В настоящей работе показано, что активность PK и SDH в сыворотке крови диабетических крыс значительно снижена. После введения крысам препаратов PD и PD-CSNPs активность этих ключевых ферментов метаболизма углеводов значительно возрастала. Повышение активности PK и SDH может быть вторичным по отношению к благоприятному влиянию PD-CSNPs на уровень инсулина и приводить, как указано выше, к усилению гликолиза и усвоения глюкозы для генерирования энергии. Наши результаты согласуются с выводами Meghana et al. [36], которые показали, что применение полидатина вызывает повышение уровня SDH в животной модели алкогольного поражения печени. Предположительно полидатин оказывает антидиабетические эффекты путем стимулирования усвоения внутриклеточной глюкозы за счет повышения экспрессии GLUT2, активации пентозофосфатного пути за счет повышения уровня SDH, а также восстанавливая гликолиз в печени путем регуляции ключевых ферментов метаболизма углеводов [37].

Для диагностики функционального состояния печени используется анализ белкового профиля [38]. В настоящей работе показано значительное снижение содержания сывороточного альбумина и общего белка в крови животных диабетической группы. Это может быть связано с повышенной скоростью конверсии аминокислот в глюкозу, глюконеогенеза, и конверсией гликогенных аминокислот в CO_2 и H_2O [39]. Также это может быть ассоциировано с нарушениями функций и структуры клеток печени, которые характеризуются низким уровнем сывороточного альбумина и общего белка [40]. Введение крысам с диабетом PD или PD-CSNPs привело к заметному повышению уровня сывороточного альбумина и общего белка, что, предположительно, опосредовано гипогликемическим эффектом полидатина. Эти результаты согласуются с данными Ince et al. [41], где было показано, что полидатин дозозависимо восстанавливает уровень общего белка и альбумина в крови крыс, нарушенные цисплатин-индуцированной токсичностью.

Как правило, дефицит инсулина и сопутствующая гипергликемия наблюдаются в результате нарушения функционирования β-клеток, которые считаются основными посредниками в процессе стимулирования продукции АФК, сопровождающем поражение печени при сахарном диабете [42]. Согласно результатам нашего исследования, в печени крыс с диабетом происходит значительное увеличение концентрации малонового диальдегида, а также снижение уровня GSH и снижение активности антиоксидантных ферментов, таких как SOD, GPx, CAT и G6PD, в сравнении с нормальными контрольными крысами. Дисфункция митохондрий, вызванная гипергликемией, и стресс эндоплазматического ретикулума способствуют аккумуляции АФК, которая, в свою очередь, способствует процессу повреждения клеток и вносит вклад в развитие диабетических осложнений, приводя к появлению необратимых окислительных модификаций [43].

Основным внутриклеточным восстановителем является НАДФН. Действительно, для функционирования всей антиоксидантной системы необходим восстановитель. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа является основным источником НАДФН, поэтому нарушение активности G6PD может приводить к изменению уровня НАДФН, таким образом влияя на всю антиоксидантную систему [44]. Таким образом, снижение уровня НАДФН в результате ингибирования активности G6PD делает клетки очень чувствительными к повреждающему действию окислителей. В соответствии с нашими результатами было показано, что сахарный диабет ведет к ингибированию активности G6PD у экспериментальных животных с диабетом и в культивированных эндотелиальных клетках [45]. Кроме того, у больных диабетом наблюдается пониженная активность G6PD в печени [46]. Пониженная активность G6PD приводит к снижению уровня внутриклеточного НАДФН, повышению содержания АФК в клетках, а также способствует окислительному стрессу. Более того, АФК могут инициировать перекисное окисление липидов путем окисления полиненасыщенных жирных кислот в мембранах гепатоцитов, что приводит к повышению проницаемости клеточных мембран и последующим повреждениям клеток [47], что также может вызывать повышение активности сывороточных ALT и AST.

Как и предполагалось, применение PD или PD-CSNPs у крыс с диабетом в значительной степени препятствовало окислению липидов за счет повышения уровня активности антиоксидантов и антиоксидантных ферментов (GSH, GPx, SOD, CAT и G6PD) и снижения уровня MDA в сравнении с контрольными крысами с диабетом. Zhang et al. [48] показали, что полидатин снижает окислительный стресс и замедляет процесс поражения печени через снижение уровня MDA и повышение активности SOD, GSH, GPx и CAT в печени. Повышенная активность G6PD, наблюдаемая у крыс в группах, по-

лучающих PD и PD-CSNP, объясняет повышенные уровни антиоксидантных ферментов. НАДФН, в основном производимый G6PD, является важнейшим кофактором для каталазы и субстратом глутатионредуктазы, поддерживая каталазу в активном состоянии и обеспечивая восстановление глутатиона с образованием GSH, который является основным акцептором свободных радикалов [49]. Антиоксидантная роль G6PD, являющейся основным источником НАДФН, недавно была хорошо описана в работе Leopold et al [50].

Ozer et al. [51] показали, что активность ALT и AST может быть использована в качестве маркеров поражения печени. Повышенная активность трансаминаз, выявленная в настоящей работе, является в большей степени следствием гипергликемии, приводящей к диабетическому поражению печени. Мы предполагаем, что пероральное применение PD и PD-CSNPs обеспечивает антиоксидантную защиту против перекисного окисления липидов благодаря мощной активности PD в качестве акцептора свободных радикалов [52]. Предположительно, данные препараты также оказывают гепатопротекторный эффект при ассоциированном с диабетом поражении печени, снижая активность ALT и AST у экспериментальных крыс. Эти результаты согласуются с данными Lai et al. [53], которые описали сходные эффекты полидатина.

В ряде работ было показано, что при диабете наблюдается повышение продукции некоторых провоспалительных цитокинов, таких как IL-1β, IL-6 и TNF-α, которые способствуют воспалению и развитию гепатического стеатоза, приводящего в итоге к поражению печени [54]. В настоящей работе показано, что уровни мРНК IL-1β и TNF-α в печени диабетических крыс были повышены, в то время как применение PD и PD-CSNPs ингибировало экспрессию этих мРНК в печени. При этом препарат PD-CSNPs показал более выраженный противовоспалительный эффект по сравнению со свободным PD. TNF-α является одним из основных цитокинов, чья экспрессия в печени значительно увеличивается у диабетических крыс, что ведет к воспалению и апоптозу клеток печени и ассоциировано с развитием окислительного стресса и гипергликемии [55, 56]. Также описан вклад IL-1β при диабете, TNF-α – при алкогольном и вирусном гепатите, диабете и поражении печени в результате ишемии/реперфузии [57, 58]. В связи с существующей ассоциацией между хроническим воспалением и осложнениями диабета, включая поражение печени, определение терапевтических мишеней, способных снижать провоспалительный ответ, является многообещающей стратегией в борьбе с осложнениями сахарного диабета. Насколько нам известно, данная работа является первым исследованием действия PD-CSNPs как гепатопротекторного и противовоспалительного средства, направленного против поражения печени при диабете. В ряде работ показано, что полидатин влияет на окислительный стресс и таким образом – на воспалительный ответ [59, 60]. Гепатопротекторное действие свободного PD и PD-CSNPs проявлялось в стимулировании активности ферментов метаболизма углеводов, ингибировании окислительного стресса путем повышения активности антиоксидантных ферментов и впоследствии модулировании провоспалительных цитокинов.

Гистологическое исследование показало наличие множества гистопатологических изменений в печени диабетических крыс, включая жировые изменения, расширенные гиперемированные синусоиды, вакуолярную дегенерацию гепатоцитов, а также отдельные гепатоциты с пикнотическими и кариолитическими ядрами. Эти результаты согласуются с данными более ранних исследований, в которых отмечались отдельные гистопатологические изменения в печени диабетических крыс [61, 62]. В соответствии с результатами биохимических исследований и анализом экспрессии генов, применение PD-CSNPs и PD вызывало заметные улучшения в большинстве образцов печени диабетических крыс, подтверждая гепатопротекторное действие этих препаратов. Следует отметить, что нагруженные полидатином хитозановые наночастицы оказывали более выраженное защитное действие по сравнению со свободным полидатином.

Метформин является одним из широко используемых лекарств при диабете и считается препаратом первой линии при лечении диабета 2-го типа. Клинические преимущества МЕТ в основном связаны со специфическим снижением выработки глюкозы в печени и улучшением периферической чувствительности к инсулину; поэтому печень является основной мишенью МЕТ [63]. Однако лечение метформином часто ассоциировано с побочными эффектами со стороны желудочно-кишечного тракта, такими как тошнота, рвота, диарея, металлический привкус и дискомфорт в брюшной полости. МЕТ также снижает абсорбцию витамина B12, что приводит к развитию анемии [64, 65]. Таким образом, существует необходимость разработки новых альтернативных препаратов растительного происхождения для лечения диабета и его осложнений с минимизацией побочных эффектов.

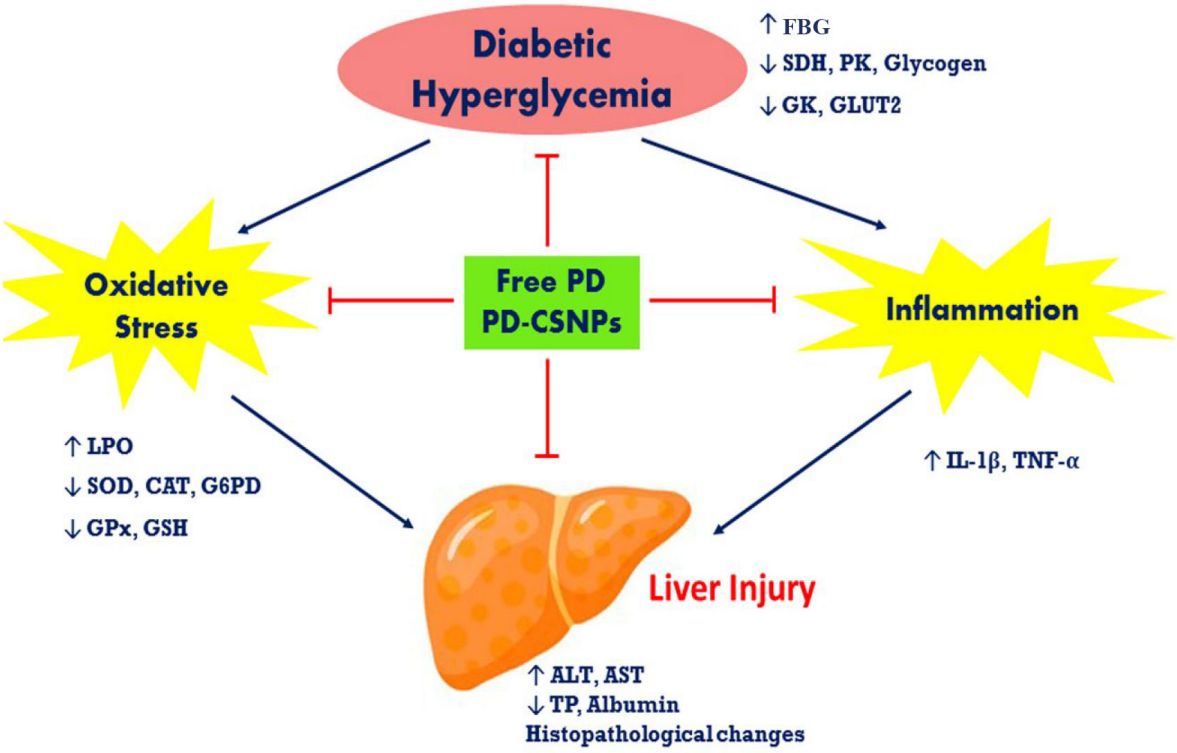

Рис. 5. Общая схема путей гепатопротекторного действия свободного PD и PD-CSNPs в печени крыс с диабетом

В связи с этим мы протестировали полидатин как потенциальное средство для лечения поражения печени, т.к. он является безопасным фитопрепаратом и обладает различными фармакологическими активностями [10, 11]. В наших предыдущих работах было продемонстрировано, что хитозановые наночастицы также безопасны и могут повысить терапевтическую эффективность полидатина, что может объясняться пролонгированным высвобождением, повышенной абсорбцией и высокой биодоступностью PD в комбинации с CSNPs [15]. Наше исследование подтвердило, что PD-CSNPs является перспективным препаратом, имеющим ряд преимуществ перед MET, особенно в случае диабетического поражения печени, вызванного окислительным стрессом. Препарат PD-CSNPs может быть адаптирован на молекулярном уровне для увеличения эффективности и минимизации побочных эффектов. Тем не менее до проведения клинических исследований необходимо провести токсикокинетические и фармакокинетические исследования нового препарата PD-CSNPs для оценки и оптимизации баланса между эффективностью и токсичностью разработанного препарата.

В настоящей работе показано, что препарат PD-CSNPs является биологически совместимым, а также имеет более выраженный защитный эффект против поражения печени в сравнении со свободным PD. Также было показано, что гепатопротекторное действие PD-CSNPs у крыс с диабетом может быть связано с (1) противодиабетическим действием путем модулирования экспрессии GLUT2 и активности ферментов метаболизма углеводов; (2) модулированием окислительного стресса благодаря антиоксидантным свойствам PD; и (3) противовоспалительным действием путем снижения содержания провоспалительных цитокинов (рис. 5). Надеемся, что результаты нашей работы также будут способствовать повышению интереса к изучению терапевтической роли PD-CSNPs при других заболеваниях печени.

Финансирование. Нет (выполнение данной работы не поддерживалось каким-либо грантом).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. При работе с лабораторными животными все процедуры были выполнены в соответствии с этическими стандартами Институционального комитета по содержанию и использованию лабораторных животных (IACUC) Университета Бени-Суэфа в Египте (номер разрешения IACUC: BSU-FS-2018-8).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cho, N., Shaw, J. E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J. D., Ohlrogge, A. W., and Malanda, B. (2018) IDF Diabetes Atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045, *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **138**, 271-281.
2. Ahlqvist, E., Van Zuydam, N. R., Groop, L. C., and McCarthy, M. I. (2015) The genetics of diabetic complications, *Nat. Rev. Nephrol.*, **11**, 277-287.
3. Bedi, O., Aggarwal, S., Trehanpati, N., Ramakrishna, G., and Krishan, P. (2019) Molecular and pathological events involved in the pathogenesis of diabetes-associated nonalcoholic fatty liver disease, *J. Clin. Exp. Hepatol.*, **9**, 607-618.
4. Angulo, P. (2002) Nonalcoholic fatty liver disease, *N. Engl. J. Med.*, **346**, 1221-1231.
5. Brownlee, M. (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications, *Nature*, **414**, 813-820.
6. Lucchesi, A. N., Freitas, N. T. D., Cassettari, L. L., Marques, S. F. G., and Spadella, C. T. (2013) Diabetes mellitus triggers oxidative stress in the liver of alloxan-treated rats: a mechanism for diabetic chronic liver disease, *Acta Cir. Bras.*, **28**, 502-508.
7. Kangralkar, V. A., Patil, S. D., and Bandivadekar, R. M. (2010) Oxidative stress and diabetes: a review, *Int. J. Appl. Pharm. Sci. Res.*, **1**, 38-45.
8. Ingaramo, P. I., Francés, D. E., Ronco, M. T., and Carnovale, C. E. (2013) in *Hot Topics in Endocrine and Endocrine-Related Diseases* (Fedele, M., ed.), IntechOpen, London, doi: 10.5772/53684.
9. Coman, C., Rugina, O. D., and Socaciu, C. (2012) Plants and natural compounds with antidiabetic action, *Not. Bot. Horti. Agrobot. Cluj. Napoca.*, **40**, 314-325.
10. Fanga, J., Luoa, L., Kea, Z., Liua, C., Yina, L., et al. (2019) Polydatin protects against acute cholestatic liver injury in mice via the inhibition of oxidative stress and endoplasmic reticulum stress, *J. Funct. Foods*, **55**, 175-183.
11. Ji, H., Zhang, X., Du, Y., Liu, H., Li, S., and Li, L. (2012) Polydatin modulates inflammation by decreasing NF-κB activation and oxidative stress by increasing Gli1, Ptch1, SOD1 expression and ameliorates blood–brain barrier permeability for its neuroprotective effect in pMCAO rat brain, *Brain Res. Bull.*, **87**, 50-59.
12. Cheng, W., Li, X., Zhang, C., Chen, W., Yuan, H., and Xu, S. (2017) Preparation and *in vivo-in vitro* evaluation of polydatin-phospholipid complex with improved dissolution and bioavailability, *Int. J. Drug Dev. Res.*, **9**, 39-43.
13. Amri, A., Chaumeil, J., Sfar, S., and Charrueau, C. (2012) Administration of resveratrol: what formulation solutions to bioavailability limitations? *J. Control Release*, **158**, 182-193.
14. Nagpal, K., Singh, S., and Mishra, D. (2013) Optimization of brain targeted chitosan nanoparticles of Rivastigmine for improved efficacy and safety, *Int. J. Biol. Macromol.*, **59**, 72-83.
15. Abdel-Moneim, A., El-Shahawy, A., Yousef, A. I., Abd El-Twab, S. M., Elden, Z. E., and Taha, M. (2020) Novel polydatin-loaded chitosan nanoparticles for safe and efficient type 2 diabetes therapy: *in silico*, *in vitro* and *in vivo* approaches, *Int. J. Biol. Macromol.*, **154**, 1496-1504.
16. Masiello, P., Broca, C., Gross R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-Buys, D., Novelli, M., and Ribes, G. (1998) Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide, *Diabetes*, **47**, 224-229.
17. Seifter, S., Dayton, S., Novic, B., and Muntwyler, E. (1950) The estimation of glycogen with the anthrone reagent, *Arch. Biochem.*, **25**, 191-200.
18. Bancroft, J. D., and Gamble, M. (2002) In *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th Ed., Churchill Livingstone, pp. 172-175.
19. Xu, C., Liu, W., Zhang, D., Cao, X., Shi, H., and Li, X. (2018) Interactions between dietary carbohydrate and metformin: implications on energy sensing, insulin signaling pathway, glycolipid metabolism and glucose tolerance in blunt snout bream Megalobrama amblycephala, *Aquaculture*, **483**, 183-195.
20. Pari, L., and Murugan, P. (2005) Effect of tetrahydrocurcumin on blood glucose, plasma insulin and hepatic key enzymes in streptozotocin induced diabetic rats, *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, **16**, 257-274.
21. Vats, V., Yadav, S., and Grover, J. (2004) Ethanolic extract of Ocimum sanctum leaves partially attenuates streptozotocin-induced alterations in glycogen content and carbohydrate metabolism in rats, *J. Ethnopharmacol.*, **90**, 155-160.
22. Wang, Y., Ye, J., Li, J., Chen, C., Huang, J., Liu, P., and Huang, H. (2016) Polydatin ameliorates lipid and glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus by downregulating proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), *Cardiovasc. Diabetol.*, **15**, 19, doi: 10.1186/s12933-015-0325-x.
23. Thorens, B., Wu, Y. J., Leahy, J. L., and Weir, G. C. (1992) The loss of GLUT2 expression by glucose unresponsive beta cells of db/db mice is reversible and is induced by the diabetic environment, *J. Clin. Invest.*, **90**, 77-80.
24. Liu, D., Regenstein, J. M., Diao, Y., Qiu, J., Zhang, H., Li, J., Zhao, H., and Wang, Z. (2019) Antidiabetic effects of water-soluble Korean pine nut protein on type 2 diabetic mice, *Biomed. Pharmacother.*, **117**, 108989, doi: 10.1016/j.biopha.2019.108989.
25. Sole, S. S., and Srinivasan, B. P. (2012) Aqueous extract of tamarind seeds selectively increases glucose transporter-2, glucose transporter-4, and islets' intracellular calcium levels and stimulates β-cell proliferation resulting in improved glucose homeostasis in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus, *Nutr. Res.*, **32**, 626-636.
26. Weir, G. C. (1993) The relationship of diabetes, loss glucose-induced insulin secretion, and GLUT2, *J. Diabetes Complications*, **7**, 124-129.
27. Zhao, F. Q., and Keating, A. F. (2007) Expression and regulation of glucose transporter in the bovine mammary gland, *J. Dairy Sci.*, **90**, E76-E86.
28. Gloyn, A. L., Odili, S., Zelent, D., Buettger, C., Castleden, H. A. J., et al. (2005) Insights into the structure and regulation of glucokinase from a novel mutation (V62M), which causes maturity-onset diabetes of the young, *J. Biol. Chem.*, **280**, 14105-14113.
29. Zhang, Y., Wei, Z., Liu, G., Deng, K., Yang, M., et al. (2019) Synergistic effects of dietary carbohydrate and taurine on growth performance, digestive enzyme activities and glucose metabolism in juvenile turbot *Scophthalmus maximus* L., *Aquaculture*, **499**, 32-41.
30. Postic, C., Shiota, M., Niswender, K. D., Jetton, T. L., Chen, Y., et al. (1999) Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase, *J. Biol. Chem.*, **274**, 305-315.
31. Li, R., Liu, H., Dong, X., Chi, S., Yang, Q., Zhang, S., and Tan, B. (2018) Molecular characterization and expression analysis of glucose transporter1 and hepatic glycolytic enzymes activities from herbivorous fish *Ctenopharyngodon idellus* in respond to a glucose load after the adaptation to dietary carbohydrate levels, *Aquaculture*, **792**, 290-299.

32. Kayne, F. J. (1973) Pyruvate kinase, in *The Enzymes*, 3rd Edn., Vol. VIII (Boyer, P. D., ed.) Academic Press, New York, pp. 353-382.
33. Gupta, V., and Bamezai, R. N. (2010) Human pyruvate kinase M2: a multifunctional protein, *Protein Sci.*, **19**, 2031-2044.
34. Oyedotun, K. S., and Lemire, B. D. (2004) The quaternary structure of the saccharomyces cerevisiae succinate dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, **279**, 9424-9431.
35. Choudhury, H., Pandey, M., Hua, C. K., Mun, C. S., Jing, J. K., et al. (2017) An update on natural compounds in the remedy of diabetes mellitus: a systematic review, *J. Tradit. Complement. Med.*, **8**, 361-376.
36. Koneru, M., Sahu, B. D., Gudem, S., Kuncha, M., Ravuri, H. G., Kumar, J. M., Kilari, E. K., and Sistla, R. (2017) Polydatin alleviates alcohol-induced acute liver injury in mice: Relevance of matrix metalloproteinases (MMPs) and hepatic antioxidants, *Phytomedicine*, **27**, 23-32.
37. Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., and Oliva-Teles, A. (2009) Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish, *Fish Physiol. Biochem.*, **35**, 519-539.
38. Soji-Omoniwa, O., Muhammad, N. O., Usman, L. A., and Omoniwa, B. P. (2014) Effect of leaf essential oil of Citrus sinensis at different harvest time on some liver and kidney function indices of diabetic rats, *Int. J. Biol. Vet. Agric. Food Eng.*, **8**, 484-488.
39. Abdel-Moneim, A., Abd El-Twab, S. M., Ashour, M. B., and Yousef, A. I. (2016) Hepato-renal protective effects of gallic acid and p-coumaric acid in nicotinamide/streptozotocin-induced diabetic rats, *Int. J. Bioassays*, **5.6**, 4641-4649.
40. Korish, A. A., and Arafah, M. M. (2013) Camel milk ameliorates steatohepatitis, insulin resistance and lipid peroxidation in experimental non-alcoholic fatty liver disease, *BMC Complement Altern. Med.*, **13**, 264, doi: 10.1186/1472-6882-13-264.
41. Ince, S., Arslan Acaroz, D., Neuwirth, O., Demirel, H. H., et al. (2014) Protective effect of polydatin, a natural precursor of resveratrol, against cisplatin-induced toxicity in rats, *Food Chem. Toxicol.*, **72**, 147-153.
42. Schmatz, R., Perreira, L. B., Stefanello, N., Mazzanti, C., Spanevello, R., et al. (2012) Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats, *Biochimie*, **94**, 374-383.
42. Fiorentino, T. V., Prioletta, A., Zuo, P., and Folli, F. (2013) Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases, *Curr. Pharm. Des.*, **19**, 5695-5703.
44. Xu, Y., Osborne, B. W., and Stanton, R. C. (2005) Diabetes causes inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase via activation of PKA, which contributes to oxidative stress in rat kidney cortex, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **289**, F1040-F1047.
45. Ulusu, N. N., Sahilli, M., Avci, A., Canbolat, O., Ozansoy, G., et al. (2003) Pentose phosphate pathway, glutathione-dependent enzymes and antioxidant defense during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs: effects of stobadine and vitamin E, *Neurochem. Res.*, **28**, 815-823.
46. Cedola, N., Cabarrou, A., Auciello, N., Doria, I., Ponce, D. L., and Baylon, N. (1974) The liver in human diabetes. Concentration of some induced enzymes, *Acta Diabetologica*, **12**, 263-271.
47. Hosni, A. A., Abdel-Moneim, A. A., Abdel-Reheim, E. S., Mohamed, S. M., and Helmy, H. (2017) Cinnamaldehyde potentially attenuates gestational hyperglycemia in rats through modulation of PPARγ, proinflammatory cytokines and oxidative stress, *Biomed. Pharmacother.*, **88**, 52-60.
48. Zhang, H., Yu, C. H., Jiang, Y. P., Peng, C., He, K., Tang, J. Y., and Xin, H. L. (2012) Protective effects of polydatin from Polygonum cuspidatum against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice, *PLoS One*, **7**, e46574, doi: 10.1371/journal.pone.0046574.
49. Kirkman, H. N., Rolfo, M., Ferraris, A. M., and Gaetani, G. F. (1999) Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry, *J. Biol. Chem.*, **274**, 13908-13914.
50. Leopold, J. A., Zhang, Y. Y., Scribner, A. W., Stanton, R. C., and Loscalzo, J. (2003) Glucose-6-phosphate dehydrogenase overexpression decreases endothelial cell oxidant stress and increases bioavailable nitric oxide, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**, 411-417.
51. Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W., and Schomaker, S. (2008) The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity, *Toxicology*, **245**, 194-205.
52. Huang, Q. H., Xu, L. Q., Liu, Y. H., Wu, J. Z., Wu, X., et al. (2017) Polydatin protects rat liver against ethanol-induced injury: involvement of CYP2E1/ROS/Nrf2 and TLR4/NF-κB p65 pathway, *Evid. Based. Complement Alternat. Med.*, **2017**, 7953850, doi: 10.1155/2017/7953850.
53. Lai Xue, L., Wub, K., Qiu, H., Huang, B., Chen, R., Xie, W., and Jiang, Q. (2017) Polydatin exhibits the hepatoprotective effects through PPAR-a/-b signaling pathway in streptozocin-induced diabetic mice, *J. Funct. Foods*, **36**, 341-347.
54. Perumpail, R. B. (2015) Pathogenesis of hepatocarcinogenesis in non-cirrhotic nonalcoholic fatty liver disease: potential mechanistic pathways, *World J. Gastroenterol.*, **7**, 2384-2388.
55. Ingaramo, P. I., Ronco, M. T., Francés, D. E., Monti, J. A., Pisani, G. B., et al. (2011) Tumor necrosis factor alpha pathways develops liver apoptosis in type 1 diabetes mellitus, *Mol. Immunol.*, **48**, 1397-1407.
56. Xiao, Y., Chen, L., Fan, Y., Yan, P., Li, S., and Zhou, X. (2019) The effect of boletus polysaccharides on diabetic hepatopathy in rats, *Chem. Biol. Interact.*, **308**, 61-69.
57. Ehses, J., Lacraz, G., Giroix, M., Schmidlin, F., Coulaud, J., et al. (2009) IL-1 antagonism reduces hyperglycemia and tissue inflammation in the type 2 diabetic GK rat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 13998-14003.
58. Ding, W., and Yin, X. (2004) Dissection of the multiple mechanisms of TNF-α-induced apoptosis in liver injury, *J. Cell Mol. Med.*, **8**, 445-454.
59. Du, Q. H., Peng, C., and Zhang, H. (2013) Polydatin: a review of pharmacology and pharmacokinetics, *Pharm. Biol.*, **51**, 1347-1354.
60. Li, T., Cai, S., Zeng, Z., Zhang, J., Gao, Y., Wang, X., and Chen, Z. (2014) Protective effect of polydatin against burn-induced lung injury in rats, *Respir. Care*, **59**, 1412-1421.
61. Teoh, S. L., Latiff, A. A., and Das, S. (2009) A histological study of the structural changes in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats treated with or without Momordica charantia (bitter gourd), *Clin Ter.*, **160**, 283-286.
62. Song, D., Yin, L., Wang, C., and Wen, X. (2020) Zhenqing recipe attenuates non-alcoholic fatty liver disease by regulating the SIK1/CRTC2 signaling in experimental diabetic rats, *BMC Complement. Altern. Med.*, **20**, 27, doi: 10.1186/s12906-019-2811-2.
63. Song, R. (2016) Mechanism of metformin: a tale of two sites, *Diabetes Care*, **39**, 187-189.
64. Nathan, D. M., Buse, J. B., Davidson, M. B., Ferrannini, E., Holman, R. R., Sherwin, R., Zinman, B., American Diabetes Association, and European Association for Study of Diabetes (2009) Medical management of hyperglycemia

in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy – a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes, *Diabetes Care*, **32**, 193-203.

65. Abdel-Moneim, A, Abdel-Reheim, E. S., Semmler, M., and Addaleel, W. (2019) The impact of glycemic status and metformin administration on red blood cell indices and oxidative stress in type 2 diabetic patients, *Malays J. Med. Sci.*, **26**, 47-60.

HEPATOPROTECTIVE EFFECTS OF POLYDATIN-LOADED CHITOSAN NANOPARTICLES IN DIABETIC RATS: MODULATION OF GLUCOSE METABOLISM, OXIDATIVE STRESS, AND INFLAMMATION BIOMARKERS*

A. M. Abd El-Hameed[1], A. I. Yousef[2], S. M. Abd El-Twab[2], A. A. G. El-Shahawy[3], and A. Abdel-Moneim[2]**

[1] *Chemistry Department, Faculty of Science, Taibah University, 30002 Al-Madinah Al-Munawarah, Saudi Arabia*

[2] *Molecular Physiology Division, Faculty of Science, Beni-Suef University, 62511 Beni-Suef, Egypt; e-mail: adel.hassan@science.bsu.edu.eg*

[3] *Materials Science and Nanotechnology Department, Faculty of Postgraduate Studies for Advanced Sciences (PSAS), Beni-Suef University, 62511 Beni-Suef, Egypt*

Polydatin (PD) has a broad range of pharmacological activities; however, its effects on diabetic liver damage are poorly studied. This work is aimed to explore possible protective effects of polydatin-loaded chitosan nanoparticles (PD-CSNPs) or PD against liver damage associated with diabetes. Diabetes was induced in rats using nicotinamide/streptozotocin treatment. Experimental rats were then divided into six groups: normal control rats, diabetic control rats, and rats orally treated with PD, PD-CSNPs, equivalent unloaded CSNPs, or metformin daily for 4 weeks. Treatment with PD and PD-CSNPs significantly reduced the blood glucose content, lipid peroxidation in the liver, and activities of serum transaminases and carbohydrate metabolism enzymes (including succinate dehydrogenase and pyruvate kinase); by contrast, liver glycogen content, glutathione concentration, and activities of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase) were markedly increased compared with control diabetic rats. Furthermore, the expression of tumor necrosis factor α and interleukin-1β mRNAs was significantly downregulated, while the expression of glucose transporter 2 and glucokinase mRNAs was strongly upregulated vs. control diabetic rats. We concluded that PD-CSNPs and PD ameliorate diabetic liver damage by modulating glucose transporter 2 expression, affecting the activity of carbohydrate metabolism enzymes, and suppressing oxidative stress and inflammation, while PD-CSNPs being more efficient than PD alone, probably due to higher bioavailability and prolonged release.

Keywords: diabetic liver damage, polydatin-loaded chitosan nanoparticles, carbohydrate metabolism enzymes, glucose transporter 2, oxidative stress