

Влияние ингибиторов тирозиновых фосфатаз на гормональные показатели и инсулиновую чувствительность у крыс с диета-индуцированным диабетом 2 типа

Деркач К.*, Зорина И., Шпаков А.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова, Российская академия наук, Санкт-Петербург, Россия

* derkatch_k@list.ru

Ключевые слова: протеинфосфотирозинфосфатаза 1В; Т-клеточная протеинфосфотирозинфосфатаза; диабет 2 типа; ингибитор; инсулиновый рецептор; лептин; инсулиновая резистентность

Мотивация и цель: Ключевыми патогенетическими факторами при сахарном диабете 2 типа (СД2), самом распространенном эндокринном заболевании в мире, приводящими к множеству осложнений, являются инсулиновая резистентность (ИР), нарушенная толерантность к глюкозе и дислипидемия. Разработка фармакологических подходов, направленных на нормализацию чувствительности к инсулину, глюкозного и липидного гомеостаза, наряду с диетой и физическими нагрузками, является магистральным направлением в лечении СД2 и его осложнений. Одной из причин ИР является повышение активности тирозиновых фосфатаз в ответ на стимуляцию клеток инсулином, которые дефосфорилируют и инактивируют инсулиновый рецептор и сопряженные с ним инсулин-рецепторные субстраты-1 и -2 (IRS1/2), ключевые компоненты инсулинового сигналинга [1, 2]. Среди фосфатаз наиболее важны протеинфосфотирозинфосфатаза 1В (PTP1B) и Т-клеточная протеинфосфотирозинфосфатаза (TCPTP), которые функционируют как негативные регуляторы инсулинового сигналинга. Они также подавляют сигнальные пути лептина, дефосфорилируя лептиновый рецептор и IRS1/2 и вызывая резистентность к лептину [3]. Вследствие этого одним из путей нормализации инсулиновой и лептиновой чувствительности при метаболических расстройствах является применение селективных ингибиторов фосфатаз, в первую очередь PTP1B [4]. Нами разработаны соединения PI4 и Comp3, ингибиторы фосфатаз PTP1B и TCPTP, созданные на основе структуры 4-оксо-1,4-дигидроциннолина, причем показано, что наибольшей эффективностью в отношении улучшения метаболического статуса и снижения ИР характеризовались ингибиторы с двойной специфичностью, ингибирующие как PTP1B, так и TCPTP [5, 6]. Однако их эффективность в отношении коррекции ИР и лептиновой резистентности при СД2 не была изучена, а также не было исследовано их влияние на показатели тиреоидной оси, функции которой нарушены при СД2. Основываясь на этом, целью работы было изучить влияние PI4 и Comp3 на метаболические и гормональные показатели, в том числе на уровни тиреотропного гормона (ТТГ) и тиреоидных гормонов, у самцов крыс с диета-индуцированным СД2.

Материалы и методы: В опытах использовали самцов крыс Wistar, эксперименты осуществляли в соответствии с требованиями Этического комитета ИЭФБ РАН (протокол № 4-2/2023 от 25 апреля 2023 г.). Животных содержали в стандартных условиях вивария в пластиковых контейнерах по 6 крыс в каждом, со свободным доступом к пище и воде. Синтез этил-3-(гидроксиметил)-4-оксо-1,4-дигидроциннолин-6-карбоксилата (PI4) и 6-хлор-3-(гидроксиметил)-циннолин-4(1H)-она (Comp3) осуществляли с помощью реакций Соногаширы и Рихтера, позволяющих сконструировать циннолиновый каркас. Целевые продукты очищали с помощью адсорбционной хроматографии (чистота не менее 98 %), структуру соединений доказывали с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения на спектрометре micrOTOF («Bruker», Германия). СД2 вызывали высокожировой диетой продолжительностью 16 недель, на 10-й неделе обрабатывая их стрептозотоцином (20 мг/кг) для декомпенсации функций панкреатических β -клеток. За 2 недели до обработки животных ингибиторами фосфатаз в диабетических группах отбирали животных с выраженными признаками СД2 и ожирения – повышением массы тела в сравнении с контролем не менее чем на 10 % и с нарушенной толерантностью к глюкозе в глюкозотолерантном тесте (ГТТ), что выражалось в ее уровне через 120 мин после глюкозной нагрузки не ниже 7.5 мМ. Затем формировали 4 группы крыс (по 6 животных в каждой) – контроль (С), СД2 без обработки (D), СД2 с 7-дневной обработкой PI4 (Dpi4) или Comp3 (Dcomp3) в суточной дозе 10 мг/кг (раствор в ДМСО). В 7-й день забирали кровь для измерения уровней ТТГ и тиреоидных гормонов. Через сутки после окончания лечения проводили повторный ГТТ, оценивая уровни глюкозы, инсулина и лептина в крови дискретно, на протяжении 120 мин после глюкозной нагрузки. Забор крови осуществляли при местной анестезии (лидокаин, 4 мг/кг). Уровни глюкозы измеряли тест-полосками «One Touch Ultra» (США), уровни инсулина, лептина и ТТГ – с помощью «ELISA for Insulin, Rat» («Cloud-Clone Corp.», США), «ELISA for Leptin, Rat» («Cloud-Clone Corp.», США) и «ELISA for TSH, Rat» («Cusabio Biotech Co., Ltd.», Китай), уровни свободного и общего тироксина (fT4, tT4) и свободного и общего трийодтиронина (fT3, tT3) – с помощью ИФА-наборов фирмы «Иммунотех» (Россия). После этого крыс наркотизировали (хлоралгидрат, 400 мг/кг), декапитировали, оценивали массу тела и жировой ткани. Для статистического анализа использовали пакет программ «Microsoft Office Excel 2007» (США). Результаты представляли, как $M \pm SD$. Нормальность распределения оценивали критерием Шапиро-Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента, для сравнения большего числа выборок – дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Достоверными считали различия при $p < 0.05$.

Результаты: У крыс с СД2 были значимо повышены масса тела и жировой ткани, уровни глюкозы и значение AUC_{0-120} , представляющее собой интегрированную площадь под глюкозной концентрационной кривой в ГТТ, а также базальный уровень лептина и стимулированные глюкозой уровни лептина и инсулина (табл.). Обработка диабетических крыс в течение недели обоими ингибиторами фосфатаз приводила к снижению массы тела и жира, причем в случае PI4 эти показатели не отличались от таковых в контроле, а также к улучшению толерантности к глюкозе и нормализации базовых и стимулированных глюкозой уровней инсулина и лептина. Более чувствительными к обработке ингибиторами фосфатаз были уровни инсулина, причем влияние PI4 на эти показатели было более выраженным

в сравнении с Сomp3 (табл. 1). Тем самым ингибиторы RTR1B и TCRTR, характеризующиеся двойной специфичностью, были эффективны для нормализации метаболических и гормональных показателей, что согласуется как с нашими ранними результатами по их применению для коррекции ожирения [5, 6], так и с данными других авторов о восстанавливающем эффекте различных ингибиторов фосфатазы RTR1B на чувствительность тканей к инсулину и лептину, хотя в этом случае эффекты таких ингибиторов при длительном лечении затухали [7]. Это может быть обусловлено тем, что подавление активности RTR1B приводило к компенсаторному усилению экспрессии и активности TCRTR, способной в некоторой степени заменять RTR1B, как негативный регулятор инсулинового и лептинового сигналинга [6].

Таблица 1. Влияние PI4 и Сomp3, наделенных двойной специфичностью ингибиторов фосфатаз RTR1B и TCRTR, на массу тела и жировой ткани, уровни глюкозы и гормональный профиль у крыс с диета-индуцированным СД2

Показатель	C	D	Dpi4	Dcomp3
Масса тела, г	345±9	430±11*	381±15#	393±10*#
Масса АЖ, г	3.9±0.5	14.4±1.7*	7.2±0.8*#	8.1±0.7*#
Масса ЭЖ, г	3.7±0.4	7.9±1.2	5.5±0.9	6.4±0.8*
Глюкоза-0, мМ	4.3±0.2	6.1±0.3*	4.0±0.2#	4.6±0.8
Глюкоза-120, мМ	5.1±0.3	9.5±1.3*	5.2±0.6#	6.2±1.4
AUC ₀₋₁₂₀ , усл.ед.	1109±46	1895±65*	1239±57#	1387±48*#
Инсулин-0, нг/мл	0.54±0.10	0.71±0.18	0.47±0.11	0.69±0.11
Инсулин-120, нг/мл	0.68±0.09	1.40±0.15*	0.77±0.10#	0.83±0.11#
Лептин-0, нг/мл	0.95±0.12	2.87±0.43*	1.77±0.18*#	1.79±0.22*#
Лептин-120, нг/мл	1.22±0.38	4.51±0.37*	2.05±0.39#	2.90±0.18*#
ТТГ, мкЕД/мл	0.56±0.09	0.71±0.12	0.50±0.05	0.58±0.07
fT4, пМ	28.8±1.3	22.1±0.8*	26.9±1.1#	25.1±1.9
tT4, нМ	76.2±6.9	69.1±7.0	73.8±4.6	72.2±3.3
fT3, пМ	2.5±0.3	2.1±0.3	2.6±0.3	2.4±0.2
tT3, нМ	3.4±0.2	2.8±0.2*	3.4±0.1#	3.2±0.3

Примечание. АЖ и ЭЖ – абдоминальный и эпидидимальный жир. «0» и «120» указывают на временные точки до и через 120 мин после нагрузки глюкозой в ГТТ.

Исследование гормональных показателей тиреоидной системы показало отсутствие значимых изменений уровня ТТГ, но уменьшение продукции fT4 и tT3, а также снижение соотношений fT4/ТТГ и tT3/ТТГ, что указывает на снижение ответа щитовидной железы на эндогенный ТТГ и признаки гипотиреоидного состояния. Обработка диабетических крыс PI4 и Сomp3 не влияла на уровень ТТГ, но частично восстанавливала уровни fT4 и tT3 и их соотношение с ТТГ, в большей степени в случае PI4 (см. табл. 1). Это указывает на индуцированное PI4 и Сomp3 улучшение тиреоидного статуса у крыс с СД2, что, как мы полагаем обусловлено повышением чувствительности их тканей к инсулину и лептину.

Заключение: Таким образом, разработанные нами ингибиторы фосфатаз с двойной специфичностью, имеющие структуру 4-оксо-1,4-дигидроциннолина, могут стать прототипами лекарственных препаратов для коррекции метаболических и гормональных расстройств при СД2.

Финансирование: Работа выполнена в рамках государственного задания ИЭФБ РАН № 075-00264-24-00.

Effect of tyrosine phosphatase inhibitors on hormonal parameters and insulin sensitivity in rats with diet-induced type 2 diabetes mellitus

Derkach K.*, Zorina I., Shpakov A.

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,
St. Petersburg, Russia*

* derkach_k@list.ru

Key words: protein phosphotyrosine phosphatase 1B; T-cell protein phosphotyrosine phosphatase, type 2 diabetes; inhibitor; insulin receptor; leptin; insulin resistance

Motivation and Purpose: The key pathogenetic factors in type 2 diabetes mellitus (T2DM), the most common endocrine disease in the world leading to many complications, are insulin resistance (IR), impaired glucose tolerance and dyslipidemia. The development of pharmacological approaches aimed at normalizing insulin sensitivity, glucose and lipid homeostasis, along with diet and physical activity, is the main direction in the treatment of T2DM and its complications. One of the causes of IR is an increase in the activity of tyrosine phosphatases in response to cell stimulation with insulin, which dephosphorylate and inactivate the insulin receptor and its associated insulin receptor substrates-1 and -2 (IRS1/2), key components of insulin signaling [1, 2]. Among the phosphatases, the most important are protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP1B) and T-cell protein phosphotyrosine phosphatase (TCPTP), which function as negative regulators of insulin signaling. They also suppress the leptin signaling pathways by dephosphorylating the leptin receptor and IRS1/2 and causing leptin resistance [3]. As a result, one of the ways to normalize insulin and leptin sensitivity in metabolic disorders is the use of selective phosphatase inhibitors, primarily PTP1B [4]. We have developed compounds PI4 and Comp3, inhibitors of the phosphatases PTP1B and TCPTP, created on the basis of the structure of 4-oxo-1,4-dihydrocinnoline, and it has been shown that inhibitors with dual specificity, inhibiting both PTP1B, were most effective in improving metabolic status and reducing IR, and TCPTP [5, 6]. However, their effectiveness in correcting IR and leptin resistance in T2DM has not been studied, and their effect on the parameters of the thyroid axis, the functions of which are impaired in T2DM, has not been studied. Based on this, the aim of the work was to study the effect of PI4 and Comp3 on metabolic and hormonal parameters, including the levels of thyroid-stimulating hormone (TSH) and thyroid hormones, in male rats with diet-induced T2DM.

Materials and Methods: Male Wistar rats were used in the experiments. The experiments were carried out in accordance with the requirements of the Ethics Committee of the IEPHB RAS (protocol No. 4-2/2023 of April 25, 2023). The animals were kept under standard vivarium conditions in plastic containers of 6 rats each, with free access to food and water. The synthesis of ethyl 3-(hydroxymethyl)-4-oxo-1,4-dihydrocinnoline-6-carboxylate (PI4) and 6-chloro-3-(hydroxymethyl)-cinnolin-4(1H)-one (Comp3) was carried out using reactions of Sonogashira and Richter, allowing the construction of a cinnoline framework. The target products were purified using adsorption chromatography (purity no less than 98 %), the structure of the compounds was proven using high-resolution mass spectrometry on a micrOTOF spectrometer («Bruker»),

Germany). T2DM was induced by a high-fat diet for 16 weeks, followed by treatment with streptozotocin (20 mg/kg) at week 10 to decompensate pancreatic β -cell function. Two weeks before treatment of animals with phosphatase inhibitors in the diabetic groups, animals with pronounced signs of T2DM and obesity were selected, such as an increase in body weight compared to the control by at least 10 % and impaired glucose tolerance in the glucose tolerance test (GTT), which was expressed in its level 120 min after a glucose load is not lower than 7.5 mM. Then 4 groups of rats (6 animals in each) were formed: control (C), T2DM without treatment (D), T2DM with 7-day treatment with PI4 (Dpi4) or Comp3 (Dcomp3) at a daily dose of 10 mg/kg (solution in DMSO). On day 7, blood was drawn to measure TSH and thyroid hormone levels. One day after the end of treatment, a repeated GTT was performed, assessing the levels of glucose, insulin and leptin in the blood discretely, over 120 min after the glucose load. Blood sampling was carried out under local anesthesia (lidocaine, 4 mg/kg). Glucose levels were measured using «One Touch Ultra» test strips (USA), insulin, leptin and TSH levels were measured using «ELISA for Insulin, Rat» («Cloud-Clone Corp.», USA), «ELISA for Leptin, Rat» («Cloud-Clone Corp.», USA) and «ELISA for TSH, Rat» («Cusabio Biotech Co., Ltd.», China), and the levels of free and total thyroxine (fT4, tT4) and free and total triiodothyronine (fT3, tT3) with using ELISA kits from «Immunotech» (Russia). After this, the rats were anesthetized (chloral hydrate, 400 mg/kg), decapitated, and body weight and adipose tissue were assessed. For statistical analysis, the «Microsoft Office Excel 2007» software package (USA) was used. The results were presented as $M \pm SD$. Normality of distribution was assessed using the Shapiro-Wilk test. To compare two samples with a normal distribution, Student's t-test was used; to compare a larger number of samples, analysis of variance with Bonferroni correction was used. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results: Rats with T2DM had significantly increased body weight and adipose tissue, glucose levels and AUC₀₋₁₂₀ value, which is the integrated area under the glucose concentration curve in the GTT, as well as basal leptin levels and glucose-stimulated leptin and insulin levels (Table 1). Treatment of diabetic rats for a week with both phosphatase inhibitors resulted in a decrease in body weight and fat, and in the case of PI4 these indicators did not differ from those in controls, as well as improvement in glucose tolerance and normalization of basal and glucose-stimulated insulin and leptin levels. Insulin levels were more sensitive to treatment with phosphatase inhibitors, and the effect of PI4 on these indicators was more pronounced compared to Comp3 (Table). Thus, PTP1B and TCPTP inhibitors, characterized by dual specificity, were effective in normalizing metabolic and hormonal parameters, which is consistent with both our early results on their use for the correction of obesity [5, 6], and with the data of other authors on the restorative effect of various inhibitors of the phosphatase PTP1B on tissue sensitivity to insulin and leptin, although in this case the effects of such inhibitors attenuated with long-term treatment [7]. This may be due to the fact that suppression of PTP1B activity led to a compensatory increase in the expression and activity of TCPTP, which can to some extent replace PTP1B as a negative regulator of insulin and leptin signaling [6]. A study of hormonal parameters of the thyroid system showed the absence of significant changes in the level of TSH, but a decrease in the production of fT4 and tT3, as well as a decrease in the ratios of fT4/TSH and tT3/TSH, which indicates a decrease in the response of the thyroid gland to endogenous TSH and signs of a hypothyroid state. Treatment of diabetic rats with PI4 and Comp3 had no effect on TSH levels, but partially restored the levels of fT4 and tT3 and their ratio to TSH, to a greater

extent in the case of PI4 (Table 1). This indicates an improvement in thyroid status induced by PI4 and Comp3 in rats with T2DM, which we believe is due to an increase in the sensitivity of their tissues to insulin and leptin.

Table 1. Effect of PI4 and Comp3, endowed with dual specificity phosphatase inhibitors PTP1B and TCPTP, on body and adipose tissue weight, glucose levels and hormonal profile in rats with diet-induced T2DM

Indicator	C	D	Dpi4	Dcomp3
Body weight, g	345±9	430±11*	381±15#	393±10*#
Weight of AF, g	3.9±0.5	14.4±1.7*	7.2±0.8*#	8.1±0.7*#
Weight of EF, g	3.7±0.4	7.9±1.2	5.5±0.9	6.4±0.8*
Glucose-0, mM	4.3±0.2	6.1±0.3*	4.0±0.2#	4.6±0.8
Glucose-120, mM	5.1±0.3	9.5±1.3*	5.2±0.6#	6.2±1.4
AUC ₀₋₁₂₀ , arb.units	1109±46	1895±65*	1239±57#	1387±48*#
Insulin-0, ng/ml	0.54±0.10	0.71±0.18	0.47±0.11	0.69±0.11
Insulin-120, ng/ml	0.68±0.09	1.40±0.15*	0.77±0.10#	0.83±0.11#
Leptin-0, ng/ml	0.95±0.12	2.87±0.43*	1.77±0.18*#	1.79±0.22*#
Leptin-120, ng/ml	1.22±0.38	4.51±0.37*	2.05±0.39#	2.90±0.18*#
TSH, μ IU/ml	0.56±0.09	0.71±0.12	0.50±0.05	0.58±0.07
fT4, pM	28.8±1.3	22.1±0.8*	26.9±1.1#	25.1±1.9
tT4, nM	76.2±6.9	69.1±7.0	73.8±4.6	72.2±3.3
fT3, pM	2.5±0.3	2.1±0.3	2.6±0.3	2.4±0.2
tT3, nM	3.4±0.2	2.8±0.2*	3.4±0.1#	3.2±0.3

Note. AF and EF – abdominal and epididymal fat. “0” and “120” indicate time points before and 120 min after glucose loading in the GTT.

Conclusion: Thus, the dual-specificity phosphatase inhibitors we have developed, having the structure of 4-oxo-1,4-dihydrocinnoline, can become prototypes of drugs for the correction of metabolic and hormonal disorders in T2DM.

Funding: The work is supported by the IEPH Research Program No. 075-00264-24-00.

Список литературы/References

1. Köhn M. Turn and face the strange: a new view on phosphatases. *ACS Cent Sci.* 2020;6(4):467-477. doi 10.1021/acscentsci.9b00909
2. Liu R. et al. Human Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B): From structure to clinical inhibitor perspectives. *Int J Mol Sci.* 2022;23(13):7027. doi 10.3390/ijms23137027
3. Zhang Z.Y. et al. Protein tyrosine phosphatases in hypothalamic insulin and leptin signaling. *Trends Pharmacol Sci.* 2015;36(10):661-674. doi 10.1016/j.tips.2015.07.003
4. Sorokoumov V.N., Shpakov A.O. Protein phosphotyrosine phosphatase 1B: Structure, function, role in the development of metabolic disorders and their correction by the enzyme inhibitors. *J Evol Biochem Physiol.* 2017;53(4):259-270. doi 10.1134/S0022093017040020
5. Деркач К.В. и др. Характеристика и биологическая активность новых ингибиторов тирозиновых фосфатаз PTP1B и TCPTP на основе 4-оксо-1,4-дигидроциннолина. *Биомедицинская химия.* 2022;68(6):427-436. doi 10.18097/PBMC20226806427
[Derkach K.V. et al. Characterization and biological activity of new 4-oxo-1,4-dihydrocinnoline-based inhibitors of the tyrosine phosphatase PTP1B and TCPTP. *Biomed Khim.* 2022;68(6):427-436. doi 10.18097/PBMC20226806427 (in Russian)]
6. Derkach K.V. et al. Dual PTP1B/TC-PTP Inhibitors: Biological Evaluation of 3-(Hydroxy-methyl)cinnoline-4(1H)-Ones. *Int J Mol Sci.* 2023;24(5):4498. doi 10.3390/ijms24054498
7. Campos-Almazán M.I. et al. Computational methods in cooperation with experimental approaches to design protein tyrosine phosphatase 1b inhibitors in type 2 diabetes drug design: a review of the achievements of this century. *Pharmaceuticals (Basel).* 2022;15(7):866. doi 10.3390/ph15070866