Емпагліфлозин зменшує периферичну нейропатію, пов'язану з цукровим діабетом 2-го типу: глюкозо-незалежний ефект через передачу сигналів AMPK

Noha F. Abdelkader, Marawan A. Elbaset, Passant E. Moustafa, Sherehan M. Ibrahim

Резюме

Діабетична периферична нейропатія (ДПН) являє собою тяжкий мікросудинний стан, який різко впливає на стан пацієнтів з діабетом, незважаючи на достатній контроль глікемії, що призводить до високої захворюваності. Так, останнім часом увагу привертають цукрознижуючі засоби, засновані на глюкозонезалежних механізмах дії. Метою цієї роботи було дослідження потенціалу селективного інгібітора натрійзалежного котранспортера глюкози 2 типу, емпагліфлозину (EMPA) покращувати спричинену стрептозотоцином ДПН у щурів та прояснення його точного сигнального механізму. Щурів розподілили на чотири групи, де контрольні тварини отримували плацебо щодня протягом 2 тижнів. В інших групах ДПН викликали одноразовими внутрішньоочеревинними ін'єкціями свіжоприготованого стрептозотоцину та нікотинаміду (52,5 мг/кг та 50 мг/кг відповідно). Потім EMPA (3 мг/кг/перорально) вводили двом групам окремо або разом з інгібітором AMPK дорсоморфіном (0,2 мг/кг/ інтраперитонеально). Незважаючи на незначний антигіперглікемічний ефект, EMPA покращував гістопатологічні зміни сідничного нерва, мієлінізацію, кількість нервових волокон і швидкість нервової провідності. Крім того, EMPA пом'якшував реакції на різні ноцицептивні стимули разом із покращенням рухової координації. EMPA модулював співвідношення ATP/AMP, підвищував регуляцію p-AMPK, одночасно знижуючи експресію p-p38 MAPK, p-ERK1/2 і, відповідно, p-NF-κB p65, а також його нижчі медіатори (TNF-α та IL-β), на додаток до посилення активності SOD і зниження вмісту MDA. Крім того, EMPA здійснював низхідну регуляцію mTOR і стимулював ULK1, а також беклін-1. Подібним чином EMPA зменшував рівні miR-21, що посилює RECK, зменшивши вміст MMP-2 і -9. Корисні ефекти EMPA майже скасовувались при введенні дорсоморфіну. На заключення, EMPA продемонстрував захисний ефект проти ДПН незалежно від свого цукрознижуючого ефекту, ймовірно, шляхом модуляції шляху AMPK, окисного та запального навантаження, ремоделювання позаклітинного матриксу та аутофагії.

Ключові слова: *емпагліфлозин, дорсоморфін, діабетична периферична нейропатія, AMPK, p38 MAPK, mTOR*

Ноха Ф. Абделькадер (Noha F. Abdelkader)

Кафедра фармакології та токсикології, Фармацевтичний факультет, Каїрський університет, Kasr El-Aini St., Cairo 11562, Egypt

Мараван А. Ельбасет (Marawan A. Elbaset)

Інститут медичних та клінічних досліджень, відділ фармакології, Національний дослідницький центр, Гіза, Єгипет

Шерехан М. Ібрагім (Sherehan M. Ibrahim)1

Кафедра фармакології та токсикології, Фармацевтичний факультет, Каїрський університет, Kasr El-Aini St., Cairo 11562, Egypt

Вступ

Цукровий діабет (ЦД) — це ендокринне метаболічне захворювання, що характеризується або резистентністю до інсуліну, або частковим / повним дефіцитом секреції інсуліну підшлунковою залозою, що призводить до постійного підвищення рівня глюкози в крові (Американська асоціація з вивчення діабету, 2009). Захворюваність і поширеність ЦД, за прогнозами Міжнародної діабетичної федерації, має перерости у пандемію до 2030 року (Saeedi et al., 2019). Діабетична нейропатія є одним з найбільш серйозних діабетичних мікросудинних ускладнень, яке вражає приблизно половину пацієнтів із ЦД 1-го і 2-го типу (Lederman, 2012), впливаючи на сенсорні, моторні та вегетативні нейрони периферичної нервової системи (Duby et al., 2004).

Діабетична периферична нейропатія (ДПН), найпоширеніший тип діабетичної нейропатії, може призвести до виразки стопи з підвищеним ризиком ампутації нижньої кінцівки (Khdour, 2020). Пацієнти страждають від оніміння та відчуття жару (Backonja та Stacey, 2004), на додаток до сенсорного болю, що вражає дистальні частини кінцівок (Dworkin et al., 2007).

Пов'язаний із цим нейропатичний біль різниться за ступенем тяжкості, що негативно впливає на життя пацієнтів, а також спричиняє значні витрати на медичне обслуговування (Sadosky et al., 2015). Крім того, дисфункція моторних нервів може викликати м'язову слабкість і втрату контролю рівноваги (Khdour 2020).

Кілька встановлених механізмів залучені в патофізіології ДПН, а саме: протеїнкіназа C, поліолові шляхи, формування кінцевих продуктів поширеного глікування та окисного стресу (Duby et al., 2004). Зосереджуючись на окисному стресі, спричиненому гіперглікемією (Obrosova, 2002; Vincent et al., 2004), ушкодження нервів може опосередкуватись індукцією мікроангіопатії нервів і судинних порушень (Cameron et al., 2001). Ці порушення тісно пов'язані з утворенням реактивних форм кисню (ROS), перекисним окисленням ліпідів, а також зниженням антиоксидантних захисних механізмів організму, таких як молекули-поглиначі (Obrosova, 2002). Згодом знижується вироблення нервової енергії (Obrosova, 2002; Vincent et al. 2004), що супроводжується порушенням аксонального транспорту білків (Fernyhough та Schmidt, 2002). У взаємозв'язку між гіперглікемією, мітохондріальною дисфункцією та окисним стресом підвищена внутрішньоклітинна концентрація глюкози стимулює мітохондріальний NADH і, відповідно, доступність електронів для дихального ланцюга, що призводить до утворення ROS (Nishikawa et al., 2000).

Протеїнкіназа, активована аденозинмонофосфатом (AMPK), є можливою молекулою-мішенню для лікування ДПН шляхом підтримки клітинного енергетичного балансу завдяки посиленню катаболічних процесів, що генерують аденозинтрифосфат (ATP), і зменшення анаболічних процесів, що споживають ATP (Shrikanth та Nandini, 2020). Крім того, Roy Chowdhury et al. (2012) виявили, що зменшений каскад AMPK перешкоджає мітохондріальній дисфункції та ушкодженню нейронів. Навпаки, активація шляху AMPK запобігала індукованому стрептозотоцином (STZ) нейрозапаленню у піддослідних тварин шляхом стимуляції мітохондріального біогенезу та аутофагії (Yerra та Kumar 2017). Крім того, це посилювало експресію антиоксидантних ферментів в експерименті in vitro (Lin et al., 2017).

Незважаючи на адекватний контроль глікемії, ДПН все ще може розвиватися серед інших мікросудинних ускладнень, особливо у пацієнтів з цукровим діабетом 2-го типу. Так, в останні роки увагу привернули нові цукрознижуючі препарати, які можуть зменшити ДПН завдяки глюкозонезалежним механізмам дії (Lee et al., 2018; Eid et al., 2020). Емпагліфлозин (EMPA) є селективним інгібітором натрійзалежного котранспортера глюкози 2 типу (НЗКТГ-2), що перешкоджає реабсорбції глюкози з проксимальних канальців нирок (Scott, 2014), призводячи до зниження рівня глюкози в крові та, зрештою, контролю ЦД 2-го типу (Grempler et al., 2012). Незважаючи на цукрознижуючий ефект EMPA, він продемонстрував багатообіцяючу ефективність проти серцево-судинних ускладнень у пацієнтів із ЦД 2-го типу (Zelniker et al., 2019) на додаток до серцевої недостатності серед інших серцево-судинних захворювань (Zhou та Wu, 2017; Packer et al., 2017). Такий ефект можна пояснити

взаємодією між впливом НЗКТГ-2 на нирки і натрій-водневим обміном, що демонструє високу активність при серцевій недостатності, що сприяє резистентності до лікування діуретиками, або до ендогенних натрійуретичних пептидів (Scott, 2014). Подібним чином, EMPA пригнічує натрій-водневий обмін у серці, зменшуючи ушкодження, гіпертрофію та ремоделювання серця (Scott, 2014). Крім того, корисні ефекти EMPA можуть бути опосередковані зниженням затримки рідини, маси тіла, артеріального тиску, запалення нирок і окисного стресу (Scott, 2014; Lee et al., 2018). Відповідно, EMPA є гарним кандидатом для оцінки можливих глюкозозалежних і незалежних захисних ефектів проти діабетичної нефропатії, як продемонстровано в кількох дослідженнях (Gembardt et al., 2014; Elrouby та Toural, 2017; Eid et al., 2020).

Кілька нещодавніх досліджень підкреслюють можливу роль EMPA для лікування периферичної нейропатії. Lee et al. (2018) у своєму попередньому дослідженні виявили, що EMPA покращував ДПН на моделі ЦД 1-го типу у щурів. Eid et al. (2020) повідомили про подібний ефект на моделі ЦД 1-го типу у мишей 1 db/+; однак EMPA неочікувано не покращував ДПН на моделі ЦД 2-го типу у мишей db/db. Оскільки інгібітори НЗКТГ-2 наразі не схвалені для лікування ЦД 1-го типу, необхідні подальші дослідження з використанням різних тваринних моделей ЦД 2-го типу, щоб перевірити ефективність EMPA при ДПН (Lee et al., 2018; Eid et al., 2020). Крім того, необхідно уточнити можливі сигнальні шляхи, що лежать в основі незалежного від глюкози захисного ефекту EMPA. Таким чином, метою цього дослідження було з'ясувати терапевтичний вплив EMPA на покращення ДПН у щурів із індукованим STZ ЦД 2-го типу, а також вивчити можливий механізм механізму EMPA, націленого на AMPK і відповідні медіатори нижчого рівня, які можуть перетинатися між собою, використовуючи інгібітор AMPK дорсоморфін (DORS).

Матеріали та методи

Піддослідні тварини

Дорослих самців щурів Вістар (170-220 г) придбали в Національному дослідницькому центрі (Гіза, Єгипет). У твариннику Фармацевтичного факультету Каїрського університету (Каїр, Єгипет) тварин утримували протягом тижня для адаптації до проведення експериментів. Їх утримували в контрольованих стандартизованих умовах при температурі 22 ±2 °C, 60 ± 10% відносної вологості і 12-годинному циклі світло/темрява. Усі щури мали необмежений доступ до водопровідної води та стандартної лабораторної їжі. Комітет з етики Фармацевтичного факультету Каїрського університету схвалив це дослідження (номер: PT 1393), яке відповідало вимогам Керівництва Національного інституту охорони здоров'я США щодо догляду та використання лабораторних тварин (публікація NIH № 85-23, переглянута у 2011 р.).

Лікарські та хімічні речовини

Емпагліфлозин придбали у компанії Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals (Інгельхайм, Німеччина), а DORS і STZ були поставлені компанією Sigma-Aldrich Co. (Сент-Луїс, Міссурі, США). Нікотинамід (NA) був наданий компанією Bayer (Ліон, Франція). Усі інші хімічні речовини, використані під час експериментів, мали аналітичний клас і максимальну чистоту. Свіжосуспендований EMPA в 1 % розчині Твіну 80 вводили перорально в дозі 3 мг/кг/д (Lee et al., 2018), тоді як DORS розчиняли свіжим в 1 % диметилсульфоксиді (DMSO) і вводили внутрішньоочеревинно в дозі 0,2 мг/кг/д (Hasanvand et al., 2018). Крім того, NA (50 мг/кг) і STZ (52,5 мг/кг) розчиняли свіжим перед використанням у нормальному фізіологічному розчині та цитратному буфері (0,1 M, pH 4,5) відповідно (Moustafa et al., 2018a; Abdelkader et al., 2022).

Індукування діабету

Нікотинамід вводили внутрішньочеревно щурам натще після ночі, за 15 хвилин до внутрішньочеревної ін'єкції STZ (Moustafa et al., 2018a; Abdelkader et al., 2022). Введення NA передувало STZ, щоб частково захистити β-клітини, що секретують інсулін, від шкідливої дії STZ (додатковий Рис. 1). Після введення STZ всім щурам давали розчин глюкози (5 %) замість водопровідної води протягом 24 годин, щоб уникнути смерті від гіпоглікемічного шоку. Після цього від-

бирали зразки крові з хвостової вени щура для оцінки рівня глюкози в крові (BGL) за допомогою портативного глюкометра ACCU-Check (Roche, Індіанаполіс, IN, США) через 2 дні після введення STZ. Лише щури з рівнем BGL > 200 мг/дл були обрані як тварини з індукованим діабетом (Moustafa et al., 2018b; Mohamed et al., 2020).

Дизайн дослідження

Як показано на Рис. 1, дане дослідження складалося з 3 незалежних експериментів (112 щурів). Під час першого експерименту 40 щурів випадковим чином розподілили на 4 групи (по 10 на групу). У групі I щури отримували 1 % розчин Твіну 80 перорально та 1 % DMSO внутрішньочеревно протягом 15 днів і виступали як контроль. Група II включала щурів з діабетом, індукованим STZ (група STZ). Щурам з діабетом у групі III вводили EMPA (3 мг/кг перорально) щодня протягом 15 днів. Дозу EMPA обрали на підставі попереднього дослідження Lee et al. (2018). Щурам із діабетом у групі IV вводили EMPA (3 мг/кг, перорально) та DORS (0,2 мг/кг, внутрішньовенно) щодня протягом 15 днів.

Усім щурам провели поведінковий аналіз через 1 день після введення останніх препаратів в порядку від найменш до найбільш стресового тесту: оцінка здатності утримуватися на барабані, що обертається; тест Рендалла-Селітто; холодова аллодинія задніх лап і, нарешті, тест на гарячій пластині. Ці тести проводили в звукоізольованій кімнаті під час світлової фази з 1-годинною перервою між експериментами (Abdelkader et al., 2017). Після цього щурів зважували та відбирали зразки крові з хвостової вени =для оцінки BGL за допомогою портативного глюкометра. Потім щурів випадковим чином розділили на 2 групи та піддали евтаназії шляхом обезголовлення. У першій когорті (n=5) обидва сідничні нерви швидко відокремили, промили крижаним фізіологічним розчином, а потім гомогенізували в буфері для лізису, що містив повний комплекс інгібіторів протеази. Гомогенати розділяли центрифугуванням при 15000 x г протягом 15 хвилин при температурі 4 °C. Супернатанти розділяли на аліквоти, потім зберігали при температурі -80 °C для подальшого визначення методом Вестерн-блоттингу фосфорильованої AMPK, мішені рапаміцину у ссавців (mTOR), мітоген-активованої протеїнкінази (p38 MAPK), багатого цистеїном білка, що індукує реверсію, з мотивами Kazal (RECK), фосфорильованого ядерного фактору каппа-B (NF-κB) p65 і фосфорильованої Unc-51-подібної кінази 1, що активує аутофагію (ULK1).

У другій когорті (n=5) сідничні нерви одного щура на групу фіксували протягом ночі в глутаровому альдегіді (2,5%) з какодилатним буфером (0,1 M, pH 7,4) для елек-

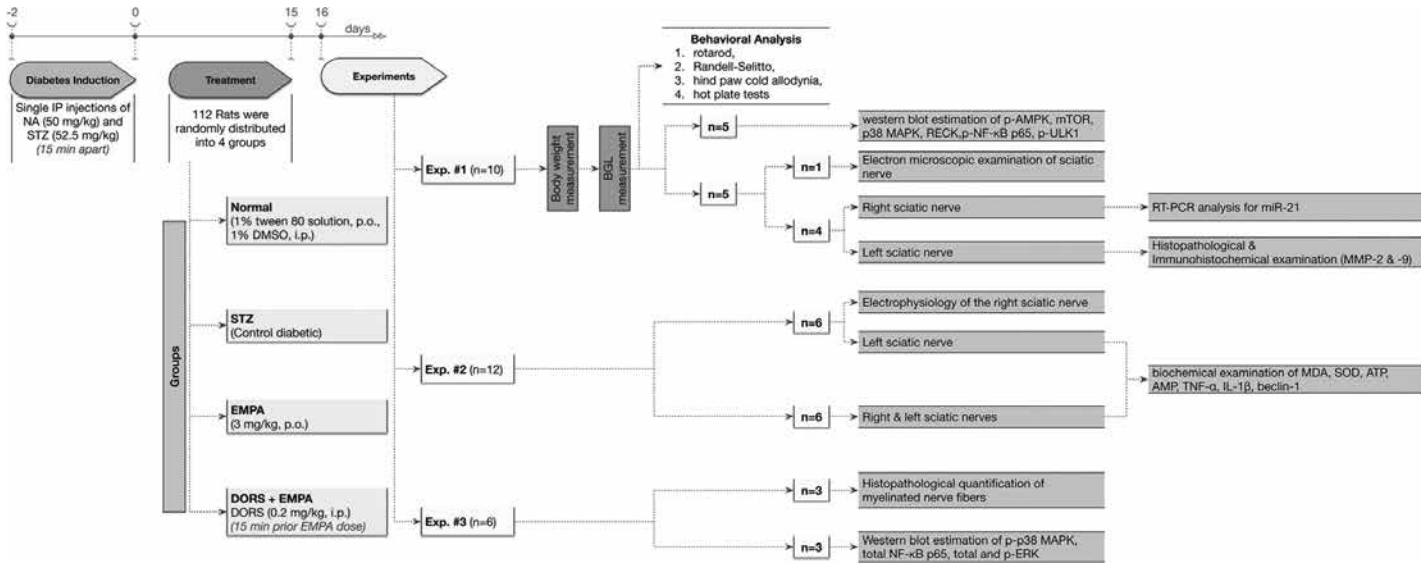

Рис. 1. *Дизайн експерименту*

тронно-мікроскопічного дослідження. Що стосується решти 4 щурів на групу, правий сідничний нерв кожної тварини негайно витягували, промивали та заморожували в рідкому азоті перед зберіганням при температурі -80 °C до використання для визначення мікроРНК-21 (miR-21) методом кількісної ПЛР у реальному часі. Крім того, ліві сідничні нерви фіксували протягом ночі у формаліні з нейтральним буфером (10%) для гістопатологічного дослідження та імуногістохімічного визначення матриксної металопротеїнази (MMP)-2 і MMP-9.

У другому експерименті 48 щурів рандомізували у 4 групи (по 12 на групу) з використанням того ж плану, що й в першому експерименті. Через добу після прийому останніх препаратів було проведено електрофізіологічний аналіз правих сідничних нервів у 6 щурів з кожної групи. Після цього всіх щурів обезголовили. Тканини сідничних нервів з обох боків обережно вирізали (за винятком правих сідничних нервів, які використовувалися в електрофізіологічному експерименті), очистили охолодженим фізіологічним розчином, висушили та зважили. Сідничні нерви від кожних 2 щурів об'єднували та гомогенізували у фосфатному буфері для оцінки біохімічних параметрів (n = 6); малоновий діальдегід (MDA), супероксиддисмутаза (SOD), ATP, аденозинмонофосфат (AMP), фактор некрозу пухлин (TNF)-α, інтерлейкін 1β (IL-1β), ортолог дріжджового Atg6 ссавців (беклін-1).

У третьому експерименті 24 щурів рандомізували у 4 групи (по 6 на групу) з використанням того ж плану, що й в попередніх експериментах. Через день після введення останніх препаратів щурів випадковим чином розділяли на 2 групи та обезголовили, потім обережно вирізали сідничні нерви та промивали охолодженим фізіологічним розчином. Сідничні нерви з першого набору (n = 3) фіксували протягом ночі у формаліні з нейтральним буфером (10 %) для кількісного визначення мієлінізованих нервових волокон. У другій когорті (n=3) сідничні нерви обробляли, як описано вище, для визначення методом Вестерн-блоттингу фосфорильованої p38 MAPK і загального NF-κB p65, а також загальної та фосфорильованої кінази, регульованої позаклітинним сигналом (ERK). Щоб уникнути суб'єктивних похибок в експерименті, під час аналізу було проведене засліплення всіх зразків.

Зміна маси тіла

Масу тіла кожної тварини вимірювали в перший і останній дні експерименту; відсоток зміни маси тіла розраховували за допомогою формули:

$$\%\ \text{Зміна маси тіла} = \frac{\text{маса тіла в останній день} - \text{маса тіла в перший день}}{\text{маса тіла в перший день}} \times 100$$

Поведінковий аналіз

Оцінка здатності утримуватися на барабані, що обертається

Координацію рухів і рівновагу щурів оцінювали за допомогою приладу Ugo Basile для прискореної оцінки здатності утримуватися на барабані, що обертається (модель 47750, Італія), де щурів розміщали в протилежному напрямку обертального стрижня при початковій швидкості 4, яку лінійно збільшували до 40 об/хв. Перед експериментом усіх щурів тренували протягом трьох послідовних днів (один сеанс на день, по 5 хвилин кожен). Результати кожного щура оцінювали, фіксуючи час падіння зі стрижня протягом 5-хвилинного тесту (Lundblad et al., 2003).

Тест Рендалла-Селітто

Механічну гіперчутливість оцінювали за допомогою анальгезиметра Ugo Basile (модель 7200, Італія). Тильну поверхню лівої задньої лапи щура піддавали постійно зростаючому тиску до появи вокалізації або рефлексу відсмикування лапи. Щурів накривали м'якою тканиною, щоб знерухомити їх під час вимірювання порогу механічного відсмикування. Щоб запобігти ушкодженню тканин, було прийнято граничну силу тиску 250 г (Leighton et al., 1988).

Холодова аллодинія задніх лап

Чутливість щурів до болю від холоду оцінювали шляхом обережного занурення задніх лап кожного щура в резервуар із холодною водою, яку підтримували при постійній температурі 4 ± 1 °C. Кожній тварині вимірювали час до відсмикування задньої лапи. Тест

проводили двічі для кожної задньої лапи з 5-хвилинним інтервалом для кожного щура, а час до відсмикування розраховували як середнє значення результатів для обох задніх лап. Під час кожного занурення вимірювали лише одну задню лапу з граничним часом 20 с, щоб уникнути ушкодження тканин. Коротший час контакту з крижаною водою може сприйматися як дуже тяжка аллодинія (Ameyaw et al., 2014).

Тест на гарячій пластині

Чутливість щурів до теплового болю оцінювали за допомогою приладу Ugo Basile для тесту на гарячій пластині (модель 7200, Італія). Окремих щурів поміщали на нагріту пластину, зафіксовану при температурі 55 ± 1 °C. Час до відсмикування або облизування задніх лап або стрибка, щоб уникнути теплового болю, документували як час реакції на гарячій пластині з граничним часом 20 с (Kamel et al., 2022).

Електрофізіологія сідничного нерва

Швидкість нервової провідності, сенсорної (SNCV) і моторної (MNCV) провідності, реєстрували, як описано вище (Ling et al., 2019; Fontanesi et al., 2019). Щурів анестезували розчином ксилазину та кетаміну (20 та 50 мг/кг, внутрішньобрюшинно, відповідно). Стимуляцію правого сідничного нерва проводили за допомогою апарату Ugo Basil ECT (модель 57800, Італія) з такими налаштуваннями: тривалість 0,1 мс, інтенсивність 20 пА та частота 50 Гц. Потім потенціал дії реєстрували за допомогою приладу PowerLab 8SP (AD Instruments, Австралія) при 10 Гц. Відстань між дистальним і проксимальним катодами ділили на різницю часу між проксимальним і дистальним катодами для визначення SNCV і MNCV.

Біохімічний аналіз

Вестерн-блоттинг

Вміст білка кількісно визначали в супернатантах сідничних нервів за допомогою набору для аналізу білка (Bio-Rad, Геркулес, CA, США). Потім зразки білка ізолювали на нітроцелюлозній мембрані за допомогою електрофорезу в додецилсульфаті натрію-поліакриламідному гелі (Amersham Bioscience, Піскатавей, NJ, США). Мембрани блокували 5 % знежиреним сухим молочним розчином у Трис-буферному фізіологічному розчині з Твіном (TBST) протягом 1 години при кімнатній температурі. Після цього мембрани інкубували протягом ночі при температурі 4 °C із розведенням 1:1000 первинних антитіл: кролячих поліклональних антитіл до mTOR (кат. №: ab2732), мишачих поліклональних антитіл до RECK (кат. №: ab88249), кролячих поліклональних антитіл до p(Ser536)-NF-κB p65 (кат. №: ab28856) від Abeam (Уолтем, MA, США), окрім кролячих поліклональних антитіл до p(Ser317)-ULK1 (кат. №: 37762), кролячих поліклональних антитіл до p(Thr172)-AMPK (кат. №: 2535), кролячих моноклональних антитіл до p(Thr180/Tyr182)-p38 MAPK (кат. №: 4511) і кролячих моноклональних антитіл до NF-κB p65 (кат. №:8242) від Cell Signaling Technology (Денверс, MA, США), на додаток до кролячих поліклональних антитіл до p38 MAPK (кат. №: AHO1202), кролячих поліклональних антитіл до ERK1/2 (кат. №: 61-7400), кролячих поліклональних антитіл до p(Thr202/Tyr204)-ERK1/2 (кат. №: 36-8800) від Thermo Fisher Scientific (Ганновер, IL, США). Після промивання TBST козячий антимишачий імуноглобулін, кон'югований пероксидазою хрону, використовували для дослідження мембран (Life Science Inc., Чикаго, IL, США). Нарешті, відповідно до інструкцій виробника, білкові смуги візуалізували за допомогою набору для посиленої хемілюмінесценції (Amersham Bioscience, Піскатавей, NJ, США). Денситометричний аналіз білкових смуг проводили за допомогою скануючого лазерного денситометра (Biomed Instrument Inc., Бруклін, NY, США), і результати нормалізували до експресії білка β-актину.

Кількісний аналіз методом ПЛР-ЗТ в реальному часі

Загальні РНК виділяли з усіх зразків за допомогою набору miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Хілден, Німеччина) відповідно до інструкцій виробника. Набір TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, MA, США) використовували для отримання одноланцюгової кДНК у реакції зворотної транскрипції з

використанням 5 мкг РНК згідно з протоколом виробника. Умова циклу синтезу кДНК включала інкубацію реакційної суміші при температурі 25 °C протягом 10 хв, при температурі 42 °C протягом 60 хв, при температурі 70 °C протягом 10 хв. Для кожного зразка аналіз проводили з використанням кДНК, $MgCl_2$ (10 мМ), Taq-полімерази (5 од/мкл), буфера для ПЛР, dNTP (10 мМ) і пари специфічних праймерів (10 мкМ) в кінцевому об'ємі реакції 20 мкл. Умови аналізу: початкова денатурація протягом 5 хв при температурі 95 °C, потім 40 циклів, ренатурація 15 с при температурі 95 °C, подовження протягом 20 с при температурі 60 °C і остаточне подовження протягом 40 с при температурі 72 °C. Були використані так праймери: miR-21, F: 5'-TAGCTTATCAGACTGATGTTGA-3' і R: 5'-GAG GTATTCGCACTGGATACG-3' і U6, F: 5'-CTCGCT TCGGCAGCACA-3', і R: 5'-A ACGCTTC ACGAATT TGCGT-3'. Порівняльну методику 2_ΔΔCt використовували для розрахунку відносної експресії досліджуваного гена з використанням U6 як конститутивного гена (Livak та Schmittgen, 2001).

Колориметричний аналіз

Визначення вмісту MDA і SOD у гомогенатах сідничних нервів проводили за допомогою спеціальних колориметричних наборів, отриманих від Bio-diagnostic (кат. №: MD2529 і SD2521, відповідно, Каїр, Єгипет) відповідно до інструкцій виробника.

Імуноферментний аналіз

Відповідно до інструкцій виробника набори для специфічного імуноферментного аналізу (ELISA), надані Mybiosource Inc. (кат. №: MBS723034, MBS7230212, MBS2507393 і MBS825017, Сан Дієго, CA, США), використовували для оцінки ATP, AMP, TNF-α та IL-1 р відповідно. У той же час для вимірювання бекліну-1 у щурів використовували набір для ELISA, отриманий від Cusabio Technology LLC (кат. №: CSB-EL002658RA, Ухань, Китай).

Гістопатологічне дослідження

Світлова мікроскопія

Фіксовані у формаліні зразки сідничних нервів обробляли для парафінування перед тим, як розрізати на зрізи по 4 мкм, а потім фарбували гематоксилін-еозином (HE) і толуїдиновим синім для дослідження під світловим мікроскопом (Culling, 2013).

Ступінь дегенерації волокон сідничних нервів, втрату клітин Шванна та інфільтрацію запальних клітин використовували для оцінки тяжкості патологічних змін у зрізах, пофарбованих HE. Використовували 4-бальну шкалу оцінки (0,1, 2 і 3), що вказувало на відсутність (0%), легкі (1–25 %), помірні (26–50 %) і тяжкі (> 50 %) патологічні зміни, відповідно (Ibrahim et al. 2020). Крім того, кількість мієлінізованих нервових волокон у кожній групі була кількісно визначали за допомогою програмного забезпечення для аналізу зображень Leica QWin (версія 3; Leica Microsystems Ltd, Хербруг, Швейцарія) з використанням 5 випадкових мікроскопічних полів, що не перекривались, для кожного зрізу, пофарбованого толуїдиновим синім.

Імуногістохімія

Для оцінки експресії MMP-2 і MMP-9 використовували залиті парафіном зрізи сідничних нервів (товщиною 4 мкм). Отримані зразки обробляли протягом 30 хвилин при кімнатній температурі 3 % перекисом водню/метанолом, потім промивали забуференим фосфатом фізіологічним розчином. Зрізи обробляли 10% козячою блокуючою сироваткою протягом 1 години при кімнатній температурі. Пізніше зразки інкубували з кролячими моноклональними антитілами до MMP-2 або MMP-9 (розведення 1:100; кат. №: MA5-13590 і MA5-14228, відповідно, Thermo Fisher Scientific, Ганновер, IL, США) протягом ночі при кімнатній температурі. Після промивання зрізи інкубували з біотинільованим вторинним антитілом (Dako, Глоструп, Данія), а потім зі стрептавідином, кон'югованим з пероксидазою хрону, протягом 60 хвилин кожен при кімнатній температурі. Проводили три додаткові промивання, потім реакцію візуалізували за допомогою 3,3'-діамінобензидину тетрагідрохлориду (набір DAB Substrate Kit, Vector Laboratories Inc., Бурлінгейм, CA, США). Скела контрастно фарбували гематоксиліном, зневоднювали, поміщали на прилад та досліджували за допомогою світлового мікроскопа. Відсоток площі імунопозитивних клітин до загальної площі мікроскопічного поля аналізували

за допомогою програмного забезпечення для аналізу зображень Leica QWin (версія 3; Leica Microsystems Ltd, Хербруг, Швейцарія) при 400-кратному збільшенні. Аналіз проводили з використанням 5 випадкових мікроскопічних полів, що не перекривались, для кожного зрізу.

Електронна мікроскопія

Коротко кажучи, зразки сідничних нервів постфіксували в тетроксиді осмію (1%), зневоднювали, заливали, розрізали на зрізи по 1 мкм. Після фарбування уранілацетатом і цитратом свинцю ультраструктуру сідничних нервів досліджували та фотографували за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа (Hitachi H-300, Hitachi LTD., Токіо, Японія). Потім їх аналізували за допомогою програмного забезпечення для аналізу зображень Digimizer (версія 5.4.4, © 2005-2020 MedCalc Software LTD), щоб виміряти співвідношення аксонів сідничних нервів до площ мієлінової оболонки (Wang et al., 2018).

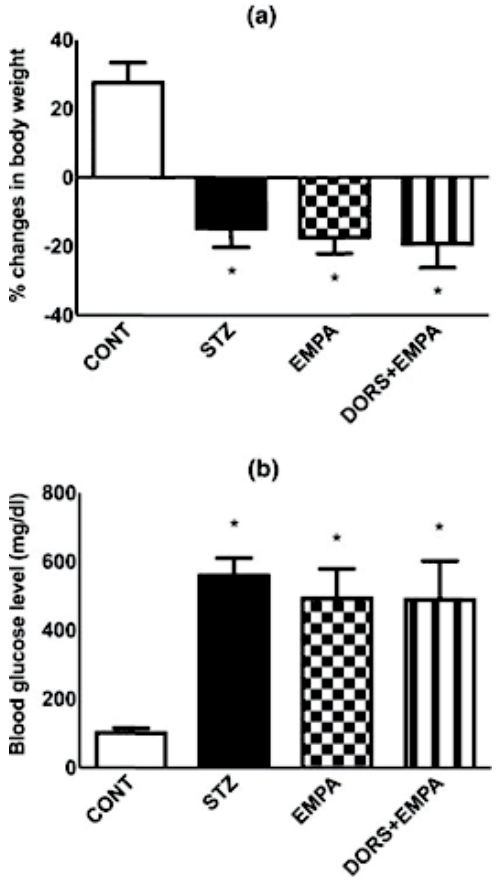

Рис. 2. *Вплив EMPA на масу тіла та рівень глюкози в крові при ДПН, індукованій STZ, у щурів. Графіки відображають (a) % зміни маси тіла та (b) рівень глюкози в крові натще*

Примітки: кожен стовпчик із вертикальною лінією відображає середнє значення ± СВ (n = 10). (*) порівняно з CONT, (@) порівняно з STZ, (#) порівняно з EMPA; P <0,05. CONT — контроль; ДПН — діабетична периферична нейропатія; DORS — дорсоморфін; EMPA — емпагліфлозин; STZ — стрептозотоцин.

Статистичний аналіз

Програмне забезпечення GraphPad Prism (версія 8, Сан-Дієго, CA, США) використовували для статистичного аналізу результатів. Усі набори даних піддавали тесту Шапіро для перевірки нормальності. Дані відображали як середнє значення ± СВ (стандартне відхилення) і аналізували за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу (ANOVA) і критерію множинного порівняння Тьюкі. З іншого боку, патологічні показники відображали як медіану та діапазон і аналізували за допомогою непараметричного U-критерію Манна-Уїтні. Ступінь значущості для всіх статистичних тестів встановлювали на рівні p <0,05. (рис. 2)

Результати

Вплив EMPA на масу тіла та рівень глюкози в крові при ДПН, індукованій STZ, у щурів

У щурів, які отримували STZ, спостерігалося зниження маси тіла (рис. 2a) разом із підвищенням рівня глюкози в крові натщесерце (рис. 2b) до 72 % і 524 %, відповідно, порівняно з контрольною групою. Крім того, введення EMPA не покращувало попередні зміни. Подібним чином у тварин, які отримували DORS + EMPA, відзначались ефекти, які спостерігалися в групах STZ і EMPA.

Вплив EMPA на моторні та сенсорні показники при ДПН, індукованій STZ, у щурів

У групі з індукованим діабетом виявляли погіршення моторних і сенсорних функцій під час поведінкових оцінок, що проявлялося у зниженні часу спадання при оцінці здатності утримуватися на барабані, що обертається (21 %; рис. 3a), граничного часу механічного відсмикування у тесті Рендалла-Селітто (46 %; Рис. 3b), часу відсмикування задньої лапи при холодовій аллодинії (27 %; рис. 3c), а також часу

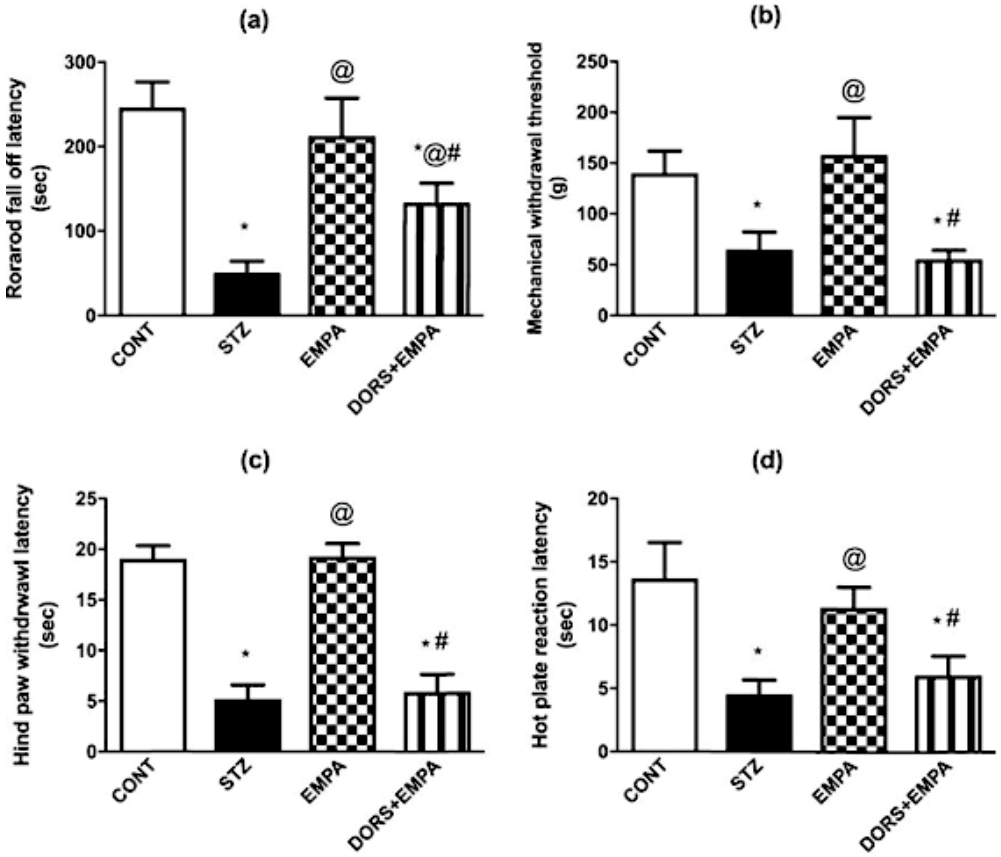

Рис. 3. *Вплив EMPA на моторні та сенсорні показники при ДПН, індукованій STZ, у щурів. Графіки відображають: (a) час спадання при оцінці здатності утримуватися на барабані, що обертається, (b) граничний час механічного відсмикування у тесті Рендалла-Селітто, (c) час відсмикування задньої лапи при холодовій аллодинії, та (d) час реакції у тесті на гарячій пластині.*

Примітки: Кожен стовпчик із вертикальною лінією відображає середнє значення ± СВ (n = 8-10). (*) порівняно з CONT, (@) порівняно з STZ, (#) порівняно з EMPA; P < 0,05. CONT — контроль; ДПН — діабетична периферична нейропатія; DORS — дорсоморфін; EMPA — емпагліфлозин; STZ — стрептозотоцин.

реакції у тесті на гарячій пластині (33 %; рис. 3d), порівняно з контрольними тваринами. Введення EMPA майже нормалізувало ці зміни, тоді як у щурів, які отримували DORS + EMPA, майже скасовувались корисні ефекти EMPA. (Рис. 3., рис. 4.).

Вплив EMPA на гістопатологічні зміни сідничних нервів при ДПН, індукованій STZ, у щурів

Мікроскопічне дослідження зрізів сідничних нервів (рис. 4a) показало, що у контрольних тварин відзначались очевидно інтактні добре організовані мієлінізовані нервові волокна, що містили численні клітини Шванна та тонку ендоневральну сполучну тканину, а також периневральний, епіневральний шар сполучної тканини без аномальних клітинних інфільтратів. Проте у щурів, які отримували STZ, спостерігалися численні осередки аксонопатій, такі як набряк нервових волокон, ендоневральний набряк, випадкова втрата мієлінової оболонки, зменшення кількості клітин Шванна в деяких пучках і значні інфільтрати мононуклеарних запальних клітин епіневральної сполучної тканини. Крім того, щодо зразків, оброблених EMPA, спостерігалось майже покращення зазначених вище змін. У той же час зрізи DORS + EMPA продемонстрували подібні, але менш серйозні ушкодження, ніж STZ. Ці ефекти також були представлені зменшенням патологічних по-

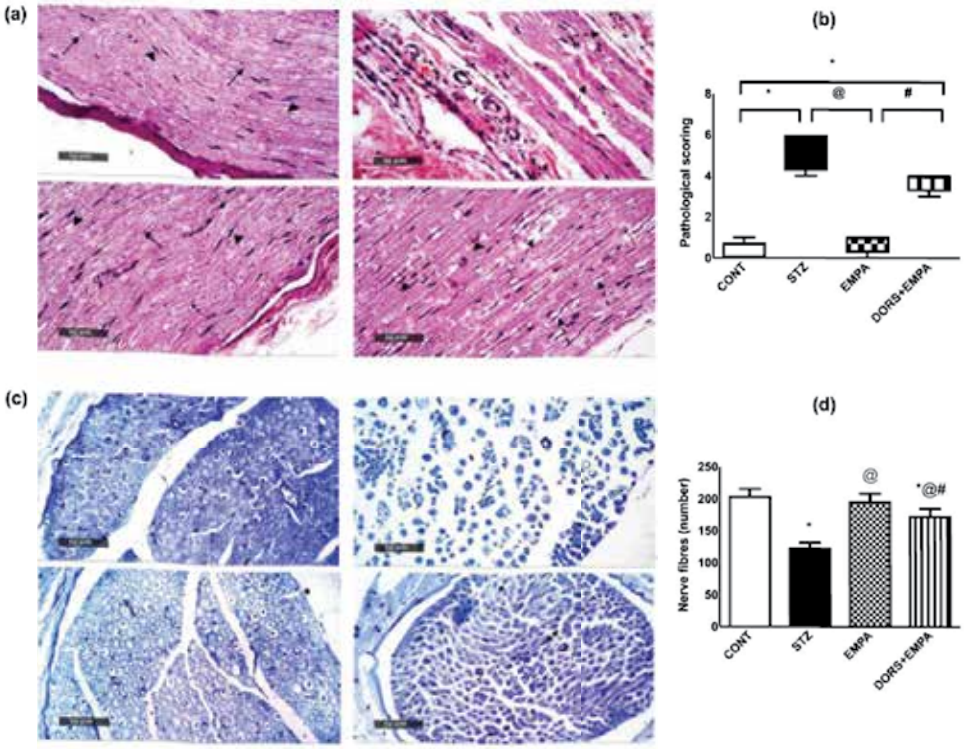

Рис. 4. *Вплив EMPA на гістопатологічні зміни сідничних нервів при ДПН, індукованій STZ, у щурів. (a) Зрізи сідничних нервів, пофарбовані гематоксиліном та еозином. Зріз CONT показує мієлінізовані нервові волокна (стрілка) і розсіяні клітини Шванна (вістря стрілки). Зріз STZ показує втрату мієлінової оболонки (пунктирні стрілки), втрату клітин Шванна (вістря стрілки) і запальні клітини (червона стрілка). Зріз EMPA показує мієлінізовані нервові волокна (стрілка) і розсіяні клітини Шванна (вістря стрілки). Зріз DORS+EMPA показує набряк (пунктирні стрілки) і помірну втрату клітин Шванна (вістря стрілки) (масштабна шкала становить 50 мкм), (b) Патологічні показники. Кожен стовпчик із вертикальною лінією відображає медіану ± діапазон (n=4). (c) Зрізи сідничних нервів, пофарбовані толуїдиновим синім (шкала 50 мкм), (d) Кількість нервових волокон.*

Примітки: Кожен стовпчик із вертикальною лінією відображає середнє значення ± СВ (n=3). (*) порівняно з CONT, (@) порівняно з STZ, (#) порівняно з EMPA; $P < 0.05$. CONT — контроль; ДПН — діабетична периферична нейропатія; DORS — дорсоморфін; EMPA — емпагліфлозин; STZ — стрептозотоцин.

казників у тварин, які отримували EMPA (рис. 4b), порівняно з STZ. Крім того, у групі STZ спостерігалося зменшення кількості нервових волокон (60,5 %) порівняно з групою CONT (рис. 4c, d). Для порівняння, в групі EMPA відзначалось збільшення кількості на 58 % порівняно з групою STZ. Крім того, у групі DORS + EMPA частково покращилась кількість нервових волокон, подібно до групи STZ. (Рис.5.).

Вплив EMPA на мікроморфологічні зміни сідничних нервів при ДПН, індукованій STZ, у щурів

Електронні мікрофотографії сідничних нервів щурів (рис. 5a) показали, що мієлінізовані нервові волокна у групі CONT мають повну та звичайну структуру. У групі STZ виявлено відшарування мієлінових пластинок, атрофію аксонів, деформацію нервових волокон. Проте група EMPA продемонструвала майже добре організовані мієлінові нервові волокна, тоді як в групі DORS + EMPA спостерігались подібні порушення мієлінових оболонок і ушкодження нервових волокон, як і в групі STZ. Крім того, співвідношення площ аксонів і мієлінової оболонки в сідничних нервах відображає ступінь атрофії аксонів і набряк мієлінової оболонки (рис. 5b). Це співвідношення покращилось у щурів, які отримували EMPA, порівняно з групами STZ або DORS+EMPA.

(а)

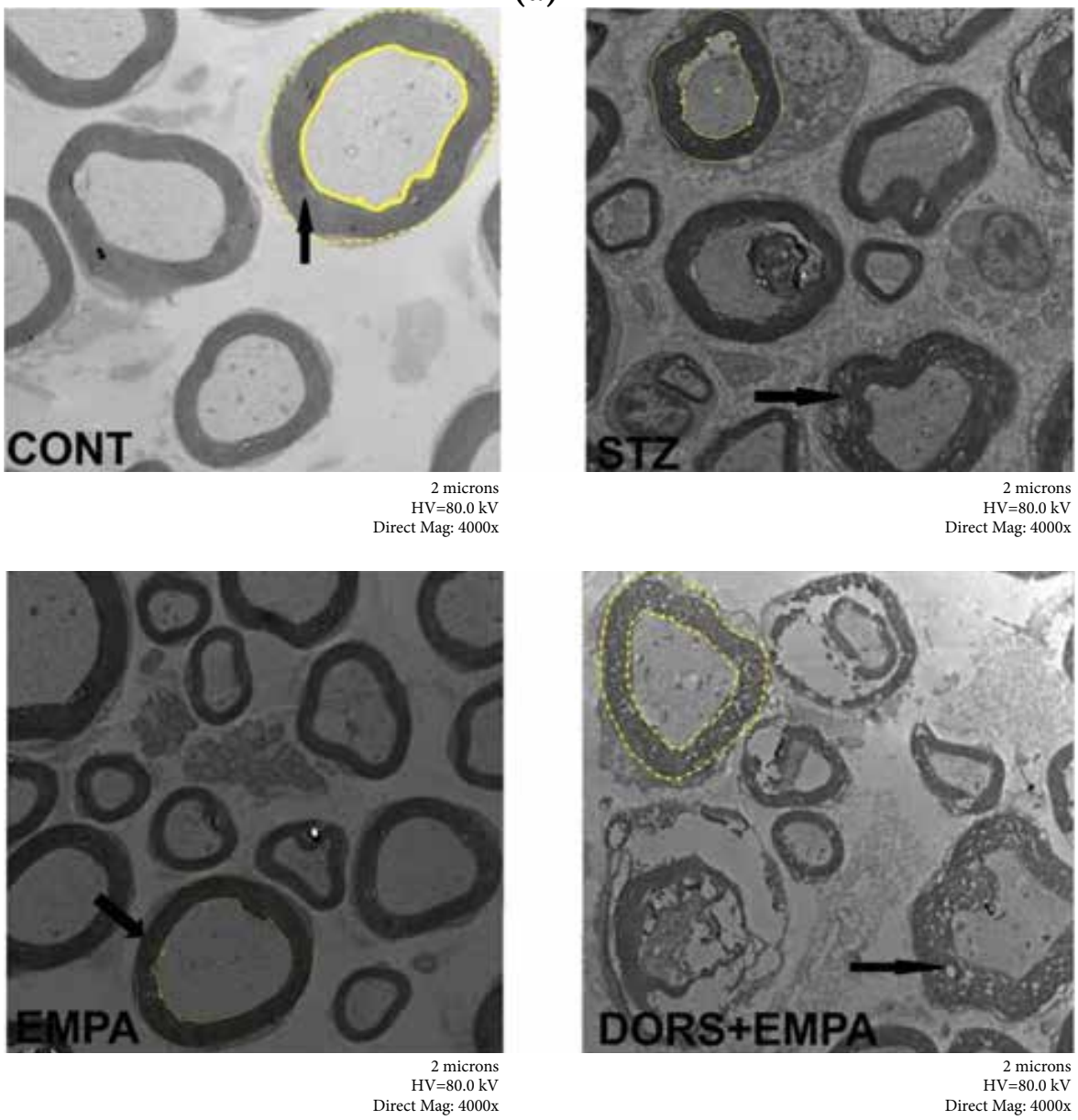

Рис. 5. *Вплив EMPA на мікроморфологічні зміни сідничних нервів при ДПН, індукованій STZ, у щурів. (a) Зрізи сідничних нервів, пофарбовані уранілацетатом і цитратом свинцю. Зріз CONT показує неушкоджену добре сформовану мієлінову оболонку (стрілка). Зріз STZ показує деформовані нервові волокна, атрофію аксонів і відшарування мієлінових пластинок (стрілка). Зріз EMPA показує майже добре сформований аксон з неушкодженою мієліновою оболонкою. Зріз DORS+EMPA показує ушкодження аксона з ділянками втрати мієліну (стрілка) (масштабна шкала становить 2 мкм), (b) Співвідношення площ аксона до площ мієлінової оболонки*

Примітки: CONT — контроль; DORS — дорсоморфін; EMPA — емпагліфлозин; STZ — стрептозотоцин.

(б)

	Площа аксона (нм²)	Площа мієліну (нм²)	Співвідношення
CONT	23.89	41.11	0.81
STZ	13.02	19.54	0.54
EMPA	19.83	29.96	0.79
DORS+EMPA	14.16	23.84	0.56

Вплив EMPA на швидкість провідності сідничних нервів при ДПН, індукованій STZ, у щурів

Згідно з Таблицею 1, SNCV і MNCV знизились на 18% і 11% відповідно у щурів, які отримували STZ, порівняно з нормальними тваринами. Проте обидві швидкості провідності нормалізувались після введення EMPA. Тим не менш, застосування DORS + EMPA незначно знижувало SNCV і значно — MNCV порівняно з групою EMPA.

Вплив EMPA на співвідношення ATP/AMP і експресію AMPK у сідничних нервах при ДПН, індукованій STZ, у щурів

Співвідношення ATP/AMP (рис. 6a) знизилося в групі STZ до 66 %, порівняно з контрольними тваринами, тоді як у щурів, які отримували EMPA, це співвідношення підвищилось на 14 % порівняно з групою з індукованим діабетом. Навпаки, застосування DORS + EMPA запобігало підвищенню співвідношення ATP/AMP, посиленому EMPA.

Крім того, EMPA стимулював експресію p-AMPK (рис. 6b, c) до досягнення 279 % порівняно з групою STZ, в якій спостерігалось зниження експресії p-AMPK до 33 % порівняно з нормальними тваринами. Крім того, введення DORS+EMPA частково скасовувало вплив EMPA на експресію p-AMPK.

Вплив EMPA на експресію NF-κB p65, p38 MAPK, ERK1/2, RECK і miR-21 у сідничних нервах при ДПН, індукованій STZ, у щурів

Введення STZ підвищувало експресію p-NF-κB p65/загального NF-κB p65 (рис. 7a, e), p-p38 MAPK/загальної p38 MAPK (рис. 7b, e), p-ERK1/2/загальної ERK1/2 (рис. 7c, e) і miR-21 (рис. 7f) у 8, 5, 5 та 4 рази, відповідно, пов'язані з контрольними тваринами. Однак застосування EMPA знижувало експресію попередніх біомаркерів на 56 %, 60 %, 57 % і 60 % відповідно порівняно з щурами з індукованим діабетом. Одночасне введення DORS і EMPA повністю запобігало супресивній дії EMPA на експресію p-p38 MAPK/загальної p38 MAPK і p-ERK1/2/загальної ERK1/2, а також miR-21, і частково пригнічувало експресію p-NF-κB p65. (Рис.6.).)

Крім того, експресія RECK (рис. 7d, e) низхідно регулювалась у щурів, які отримували STZ, до 22 %, порівняно з контрольною групою; однак при введенні EMPA ця експресія підда-

Таблиця 1. *Вплив EMPA на швидкість сенсорної та моторної провідності сідничних нервів при ДПН, індукованій STZ, у щурів*

	SNCV (м/с)	MNCV (м/с)
CONT	52.54 ±2.10	48.34±0.90
STZ	42.88 ±3.58*	43.16 ± 1.03*
EMPA	49.71 ±1.90@	50.49 ±2.49@
DORS+EMPA	46.94± 3.63*	45.78 ±2.72#

Примітки: Результати відображені як середнє значення ± СВ (n = 6). CONT — контроль, DORS — дорсоморфін, EMPA —емпагліфлозин, MNCV — швидкість моторної провідності, SNCV — швидкість сенсорної провідності, STZ — стрептозотоцин. *CONT, @STZ, *EMPA; P<0.05

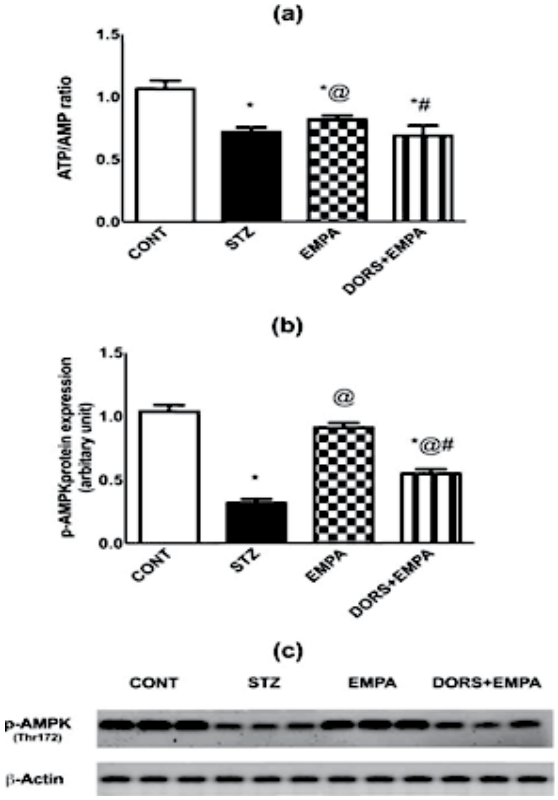

Рис. 6. *Вплив EMPA на співвідношення ATP/AMP та експресію AMPK у сідничних нервах при ДПН, індукований STZ, у щурів. Графіки відображають: (a) співвідношення ATP/AMP, (b) експресію білка p-AMPK (Thr172) і (c) відповідні смуги Вестерн-блоттингу p-AMPK*

Примітки: Результати відображені як середнє значення ± СВ (n= 3-6). (*) порівняно з CONT, (@) порівняно з STZ. (#) порівняно з EMPA; P <0,05. AMP — аденозинмонофосфат; AMPK — аденозинмонофосфаткіназа; ATP — аденозинтрифосфат; CONT — контроль; ДПН — діабетична периферична нейропатія; DORS — дорсоморфін; EMPA — емпагліфлозин; STZ — стрептозотоцин.

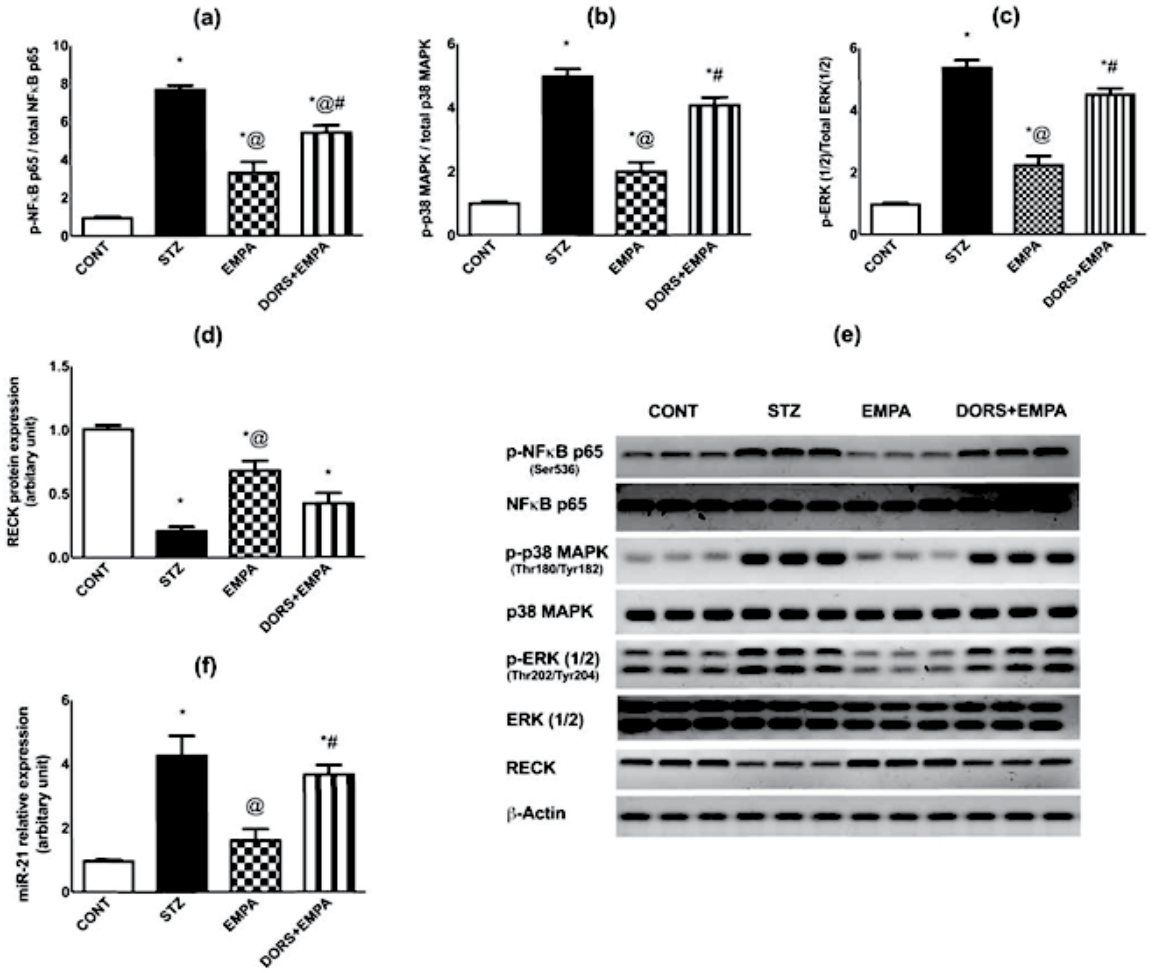

Рис. 7. *Вплив EMPA на експресію NF-κB p65, p38 MAPK ERK1/2, RECK і miR-21 в сідничних нервах при ДПН, індукованій STZ, у щурів. Графіки відображають експресію білка (a) p-NF-κB p65/загального NF-κB p65, (b) p-p38 MAPK/загальної p38 MAPK, (c) p-ERK1/2/загальної ERK1/2, (d) RECK, та (e) відповідні смуги Вестерн-блоттингу разом із відносною експресією (f) miR-21*

Примітки: Результати відображені як середнє значення ± СВ (n = 3-4). (*) порівняно з CONT, (@) порівняно з STZ, (#) порівняно з EMPA; P < 0,05. CONT — контроль; ДПН — діабетична периферична нейропатія; DORS — дорсоморфін; EMPA — емпагліфлозин; ERK — позаклітинні сигнал-регульовані кінази; MAPK — мітоген-активована протеїнкіназа; miR — мікро-РНК; NF-κB — ядерний фактор каппа-B; RECK — багатий цистеїном білок, що індукує реверсію, з мотивами Kazal; STZ — стрептозотоцин.

валась висхідній регуляції на 213%, порівняно з групою STZ. Тим не менш, застосування DORS + EMPA частково зменшувало експресію RECK порівняно з тваринами, які отримували EMPA.

Вплив EMPA на експресію MMP-2 і MMP-9 у сідничних нервах при ДПН, індукованій STZ, у щурів

Імуногістохімічна експресія MMP-2 (рис. 8a, c) і MMP-9 (рис. 8b, d) посилювалась у тварин, які отримували STZ, що підтверджується високим % площі (в 10 і 39 разів, відповідно), а також наявністю коричневого фарбування, порівнянного з нормальними щурами. Крім того, EMPA значно знижував експресію цих металопротеїназ порівняно з тваринами з індукованим діабетом. Тим не менш, введення DORS + EMPA майже блокувало цей ефект у групі EMPA.

Вплив EMPA на експресію mTOR і ULK1 і вміст бекліну-1 у сідничних нервах при ДПН, індукованій STZ, у щурів

У групі STZ спостерігалось підвищення експресії mTOR (рис. 9a, в) в 7,5 рази, порівняно з контрольними тваринами, тоді як введення EMPA знижувало цю експресію на 47 %

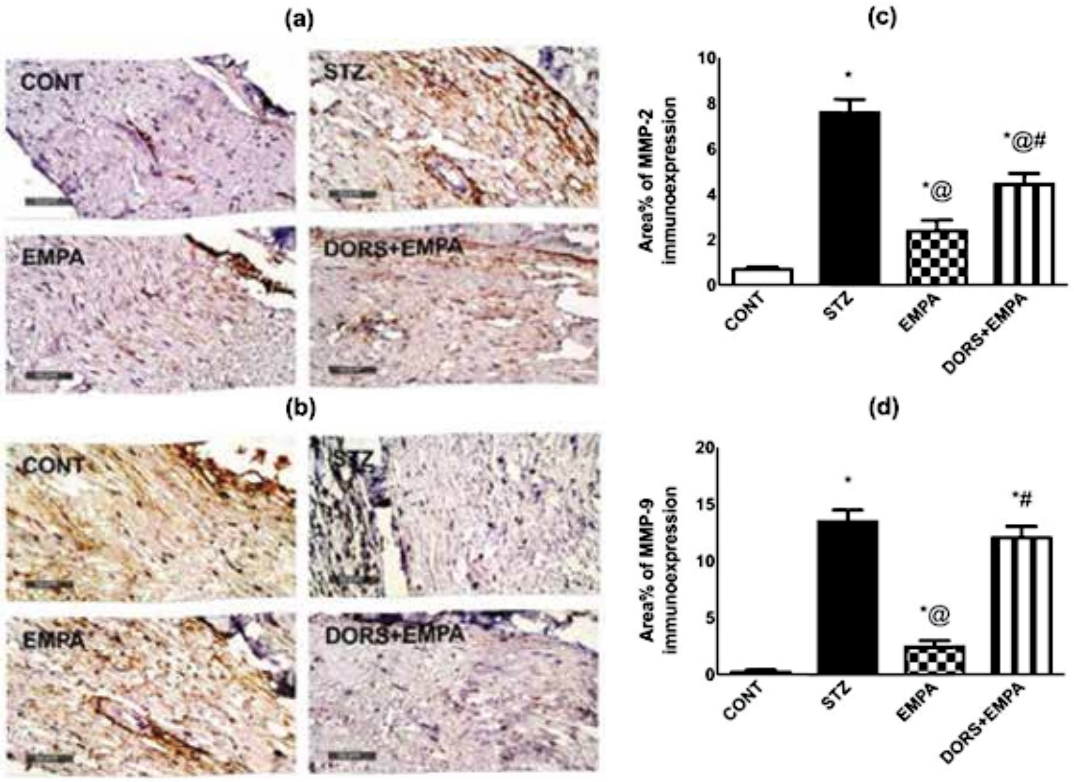

Рис. 8. *Вплив EMPA на експресію MMP-2 та MMP-9 у сідничних нервах при ДПН, індукований STZ, у щурів. Репрезентативні мікрофотографії, що відображають імуногістохімічне фарбування (a) MMP-2 та (b) MMP-9 у сідничних нервах (масштабна шкала становить 50 мкм). Графіки відображають відповідну площу % імуноекспресії (c) MMP-2 та (d) MMP-9*

Примітки: Результати відображені як середнє значення ± СВ (n = 4). (*) порівняно з CONT, (@) порівняно з STZ, (#) порівняно з EMPA; P < 0,05. CONT — контроль; ДПН — діабетична периферична нейропатія; DORS — дорсоморфін; EMPA — емпагліфлозин; MMP — металопротеїназа; STZ — стрептозотоцин.

відносно групи STZ. Натомість у щурів, які отримували DORS + EMPA, спостерігались незначні зміни порівняно з тими, яким вводили STZ.

Крім того, відносна експресія ULK1 (рис. 9b, c) і вміст бекліну-1 (рис. 9d) знижувались в групі STZ до 43 % і 37 % відповідно порівняно з контрольними тваринами, тоді як введення EMPA підвищувало експресію ULK1, а також вміст бекліну-1 у сідничному нерві на 95% і 110% відповідно порівняно з щурами з індукованим діабетом. Крім того, застосування DORS + EMPA скасовувало ефекти EMPA.

Вплив EMPA на вміст TNF-α, IL-1ß і MDA та активність SOD у сідничних нервах при ДПН, індукованій STZ, у щурів

Рівні цитокінів, TNF-α та IL-1 ß, а також біомаркера окисного стресу, MDA, підвищувались в групі STZ на 107 %, 109 % і 170 % відповідно, подібно до контрольних тварин, як показано в Таблиці 2. У той же час застосування EMPA покращувало ці ефекти на 7 %, 5 % і 32 %, порівняно з групою з індукованим діабетиком. І навпаки, у щурів, які отримували DORS+EMPA, ефекти EMPA різною мірою скасовувались. З іншого боку, введення EMPA підвищувало активність SOD на 50 %, порівняно з групою STZ, в якій спостерігалось зниження активності SOD до 52 % порівняно з контрольними тваринами (Таблиця 2). Навпаки, спільне введення DORS і EMPA скасовувало антиоксидантний потенціал EMPA.

Обговорення

Діабетична периферична нейропатія є поширеним ускладненням діабету, що проявляється у вигляді спонтанної аллодинії та гіпералгезії приблизно у половини пацієнтів (Jensen та Finnerup, 2014). У даній роботі, на

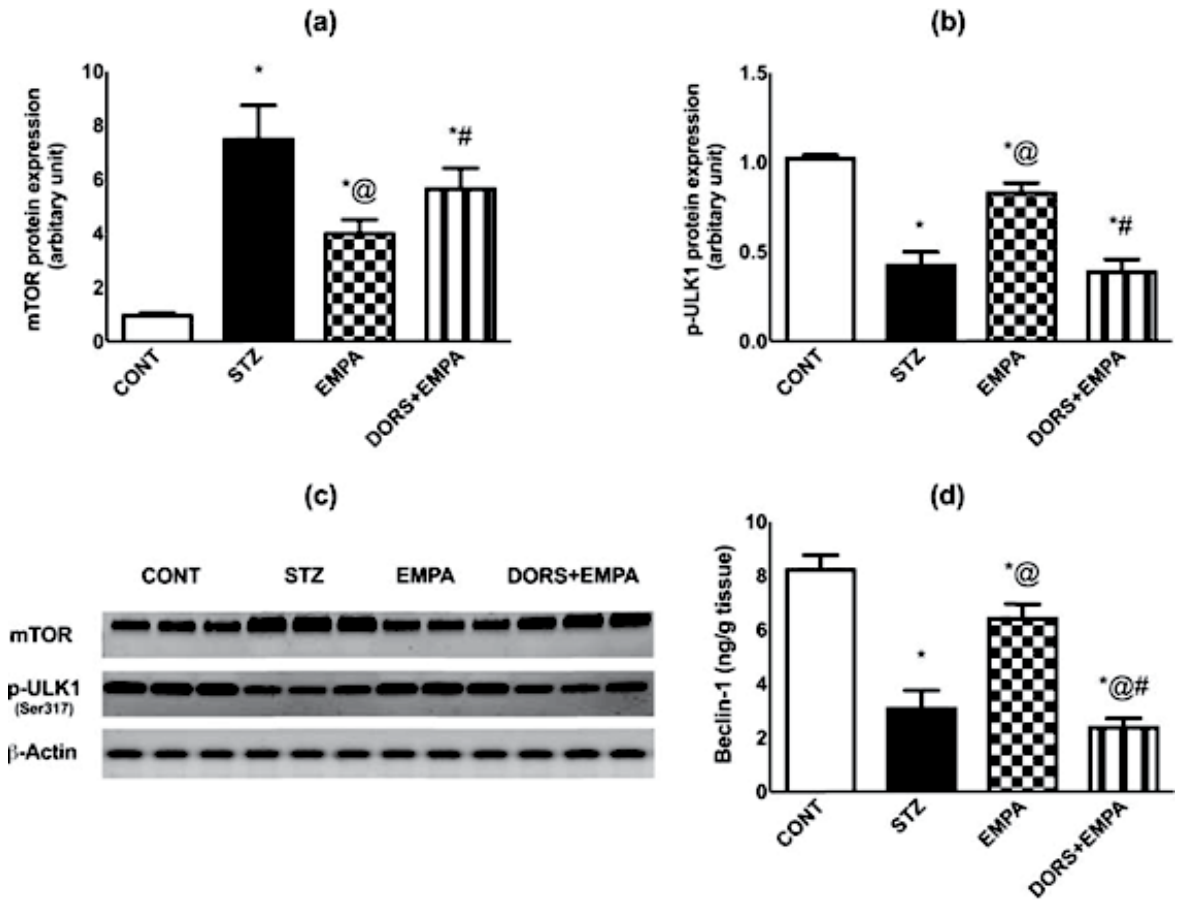

Рис. 9. *Вплив EMPA на експресію mTOR і ULK1 і вміст бекліну-1 у сідничних нервах при ДПН, індукованій STZ, у щурів. Графіки відображають експресію білка (a) mTOR і (b) ULK1 (Ser317), (c) відповідних смуг Вестерн-блоттингу mTOR і ULK1 і (d) вміст бекліну-1*

Примітки: Результати відображені як середнє значення ± СВ (n = 3-6). (*) — порівняно з CONT, (@) — порівняно з STZ, (#) —порівняно з EMPA; P < 0,05. Беклін-1 — ортолог дріжджового Atg6 у ссавців; CONT — контроль; ДПН — діабетична периферична нейропатія; DORS — дорсоморфін; EMPA — емпагліфлозин; mTOR — мішень рапаміцину у ссавців; STZ — стрептозотоцин; ULK1 — Unc-51-подібна кіназа 1, що активує аутофагію.

додаток до антигіперглікемічного ефекту, EMPA полегшував ДПН, індуковану STZ, у щурів шляхом покращення ноцицептивного порогу, що демонструється покращеною відповіддю на температурні стимули відповідно до роботи Lee et al. (2018). Тест на гарячій пластині показав гіперреакцію у тварин з індукованим діабетом, як показано в попередніх дослідженнях (Mabley et al., 2003; Zan et al., 2017). Крім того, введення EMPA модулювало гіпералгезію та холодову аллодинію, ускладнену нейропатичним болем, спричиненим ушкодженням периферичних нервів (Allchorne et al., 2005).

Подібним чином Lee et al. (2018) показали, що EMPA запобігав гіперчутливості у щурів з індукованим діабетом під час тесту з анальгезиметром. Крім того, EMPA модифікував поведінкові тести, пов'язані з ноцицептивним і больовим порогом, і покращував координацію рухів під час оцінки здатності утримуватися на барабані, що обертається, яка порушувалась при ДПН, індукованій STZ, у піддослідних тварин (Sharma et al., 2012; Abdelkader et al., 2022). За даними Lee et al., (2018), поліпшення ДПН при застосуванні EMPA підтверджувалось покращенням гістопатологічної структури сідничних нервів. На додаток до збереження мієліну, виявленого електронним мікроскопом, такі зміни спостерігалися при невропатії, індукованій STZ, у щурів (Zangiabadi et al., 2011, 2014; Lee et al., 2018; Abdelkader et al., 2022).

У поточній роботі, хоча EMPA не підтримував ані рівень глюкози в крові, ані масу

Таблиця 2. *Вплив EMPA на вміст TNF-α, IIL-1ß та MDA та активність SOD у сідничних нервах при ДПН, індукованій STZ, у щурів*

	TNF-α (пг/г тканини)	IL-1ß (пг/г тканини)	MDA (мкмоль/г тканини)	SOD (Од/г тканини)
CONT	405 ±4.5	240 ±3.5	5.6 ±0.29	6.5 ±0.92
STZ	435±7.1*	261 ±5.3*	9.5 ±0.22*	3.4±0.15*
EMPA	406 ±4.3@	248±3.1*@	6.5 ±0.056*@	5.1 ±0.16*@
DORS+EMPA	425±4.5*@#	260±6.2*#	7.1 ±0.24*@#	3.4±0.36*#

Примітки: Результати відображені як середнє значення ± СВ (n = 6). CONT — контроль, ДПН — діабетична периферична нейропатія, DORS — дорсоморфін, EMPA — емпагліфлозин, IL-1ß — інтерлейкін-1ß, MDA — малоновий діальдегід, STZ — стрептозотоцин, SOD — супероксиддисмутаза, TNF-α — фактор некрозу пухлини-α. *CONT, @STZ, #MPA; P<0.05

тіла, він зупиняв окисний стрес шляхом стимуляції активності SOD і зниження перекисного окислення ліпідів. Подібним чином EMPA підвищував рівні p-AMPK, покращував співвідношення ATP/AMP і пригнічував передачу сигналів p-p38 MAPK/p-ERK1/2/p-NF-κB p65/IL-1ß та TNF-α. Слід зазначити, що EMPA перешкоджав експресії miR-21 і посилював експресію RECK, знижуючи експресію матриксної металопротеїнази.

У даній роботі введення EMPA в дозі 3 мг/кг/д не забезпечувало ні контролю глікемії, ні підтримки маси тіла. Цей ефект узгоджується з публікацією Lee et al. (2018), згідно з якою опосередкований EMPA антигіперглікемічний ефект був дозозалежним. Між тим, постійна втрата маси тіла, що спостерігалась в нашій роботі, може бути пов'язана з помірним осмотичним діурезом і втратою калорій із сечею, спричиненою EMPA (Kovacs et al., 2014). Таким чином, потенційний вплив EMPA на лікування ДПН, як НЗКТГ-2 канагліфлозин інгібував комплекс I в ембріональних клітинах нирок і печінки людини, активуючи AMPK і таким чином зменшуючи запалення (Hawley et al., 2016). Що стосується EMPA, він відновлював співвідношення AMP/ATP, що активувало AMPK, таким чином зберігаючи серцеву та мітохондріальну функцію в кардіоміоцитах мишей. Крім того, EMPA може або фосфорилювати, або подовжувати активацію AMPK (Zhou et al. 2018). Крім того, Lu et al. (2020) продемонстрували, що EMPA може активувати AMPK, стимулюючи його активатор вищого рівня — печінкову кіназу B1 (LKB1). Крім того, Ibrahim et al. (2022) показали, що інгібітор НЗКТГ-2 дапагліфлозин безпосередньо фосфорилює LKB1, що призводить до посилення експресії p-AMPK у гіпокампі на моделі хвороби Альцгеймера у щурів із оваріектомією/оброблених D-галактозою.

У поточній роботі опосередкована EMPA активація AMPK у сідничних нервах пригнічувала передачу сигналів MAPK, що відігравало вирішальну роль у невропатичному болю через сенсибілізацію периферичних ноцицепторів і зменшувало рівні білків, пов'язаних із пластичністю (Obata та Noguchi ,2004; Anand et al., 2011). Як зазначено тут, попередні дослідження показали, що фосфорилювання p38 MAPK на Tyr182 і Thr180, а також фосфорилювання ERK на Thr202 і Tyr204 були переважаючими в експериментальних моделях нейропатії (Jin et al., 2003; Schäfers et al., 2003; Tsuda et al., 2004; Zhuang et al., 2005). Крім того, повідомлялось, що використання інгібіторів p38 MAPK або ERK полегшує таку нейропатичну шкоду. Слід зазначити, що активація AMPK негативно регулює p38 MAPK і ERK1/2 шляхом фосфорилювання адапторних білків, які регулюють рецепторні тирозинкінази, а також інгібування малих GTPаз, які є активаторами передачі сигналів MAPK вищого рівня (Asiedu et al., 2016). У цьому контексті індукована EMPA активація AMPK інгібувала p38 MAPK і активацію ERK1/2 у гепатоцитах мишей, інтоксикованих тетрахлоридом водню.

У поточному дослідженні зниження MNCV і SNCV, що спостерігалося у щурів, яким вводили STZ, могло бути опосередковано через стимульоване шляхом поліолу сигналювання p38 MAPK, що призвело до дефіциту NCV (Agthong та Tomlinson, 2002). Введення EMPA покращувало як MNCV, так

і SNCV відповідно до даних Eid et al. (2020), вказуючи на те, що EMPA частково збільшував MNCV і SNCV на моделі ЦД 1 типу у мишей.

Слід зазначити, що EMPA може модулювати NCV шляхом низхідної регуляції p38 MAPK у сідничних нервах, що узгоджується з більш ранньою роботою, яка демонструє репресивний ефект EMPA на p38 MAPK in vitro (Das et al., 2020). Крім того, інгібуюча дія EMPA на p38 MAPK може виникати через пригнічення окисного стресу, яке спостерігалось у нашому дослідженні та представлене зниженням перекисного окислення ліпідів і посиленням активності SOD, що узгоджується зі спостереженнями Das et al. (2020) та Eid et al. (2020), які задокументували антиоксидантну здатність EMPA на різних моделях. Дійсно, збільшення утворення ROS через гіперглікемію призвело до зниження потенціалу мітохондріальних мембран з подальшим виснаженням ATP, що в кінцевому підсумку спричинило ослаблення нервової провідності (Visnagri et al., 2012).

Подібним чином, після ушкодження нерва, p38 MAPK/ERK1/2 здійснювала висхідне регулювання транскрипційного фактору NF-κB p65, як показано тут (Ji та Suter, 2007; Milligan та Watkins, 2009), а також посилювало відповідні медіатори нижчого рівня, а саме IL-1ß і TNF-α (Krakauer, 2004). Ці медіатори запалення стимулюють ноцицептивні нейрони, розвиваючи гіперчутливість до болю (Ji та Suter, 2007). У нашому дослідженні EMPA зменшував шкідливий ефект таких медіаторів запалення шляхом пригнічення експресії p-p38 MAPK/p-ERK1/2/p-NF-κB p65, що збігається з попередніми дослідженнями, які демонструють потенційний вплив EMPA на лікування запальних захворювань нирок, а також запалення печінки та фіброз через пригнічення цієї осі (Das et al., 2020; Abdelhamid et al., 2021).

Слід зазначити, що інгібуюча дія EMPA на NF-κB p65/TNF-α та IL-1ß може бути пов'язана з активацією AMPK, про яку повідомляється в нашому дослідженні. Паралельно з цим, попереднє дослідження продемонструвало зв'язок між цим сигнальним шляхом, де активація AMPK низхідно регулювала NF-κB при повному запаленні тканин шкіри, спричиненому ад'ювантом Фрейнда, таким чином зменшуючи рівні медіаторів запалення, що призводило до зменшення відчуття болю (Xiang et al., 2019).

У поточній роботі mTOR сприяла розвитку ДПН у тварин, які отримували STZ, завдяки зниженій внаслідок гіперглікемії активації AMPK або підвищенню TNF-α, як було задокументовано раніше (He et al., 2019). Крім того, пов'язану з mTOR ДПН можна пояснити зниженням рівнів адапторного білка APPL1, що відіграє вирішальну роль у пластичності синапсів, або активацією mTOR. Таким чином, індукцію механічної та термічної гіпералгезії може стимулювати опосередковане синапсином II розростання нейритів, що беруть участь у гіпералгезії (He et al., 2019). Навпаки, ця гіпералгезія покращувалась при введенні EMPA через модуляторний вплив на AMPK та/або опосередковані EMPA протизапальні властивості, як показано у нашій роботі. Нещодавно Sun et al. (2020) повідомили про вплив EMPA на зменшення сигналу AMPK/mTOR при серцевій дисфункції, пов'язаній з ожирінням, у мишей. Слід зазначити, що за допомогою альтернативного механізму інгібування mTOR може покращити ДПН через індукцію аутофагії, видалення будь-яких ушкоджених клітинних компонентів та сприяння коригуванню метаболічних потреб клітинами, таким чином збільшуючи товщину мієлінової оболонки та мієлінізовані аксони (Liu et al., 2018). Низхідна регуляція mTOR стимулювала фосфорилювання ULK1, а отже, активацію бекліну-1, полегшуючи біль через посилення аутофагії (Russell et al., 2013). Цей ефект узгоджувався з дослідженням, згідно з яким EMPA покращував діабетичну тубулопатію шляхом контролю аутофагії (Lee et al., 2019).

Слід зазначити, що у нашому дослідженні експресія MMP-2 і MMP-9 в сідничних нервах висхідно регулювалась в групі тварин з індукованим діабетом, що узгоджується з даними Moustafa et al. (2018b), які задокументували покращення ДПН завдяки контролю ремоделювання позаклітинного матриксу (ECM). Ці металопротеїнази брали участь у ДПН, розкладаючи компоненти ECM, причетні до аномалій артерій, що призводять до ішемії та нервової смерті (Singh et al. 2011). Це підвищення може бути пов'язане з поси-

ленням окисного стресу/p38 MAPK/NF-κB p65, що впливає на регуляцію транскрипції ММР, як спостерігається при фотостарінні та фотоканцерогенезі (Pittayapruek et al. 2016). Крім того, спостережуваний модуляторний ефект EMPA на експресію ММР можна пояснити посиленням експресії RECK, ендогенного інгібітора ММР, шляхом інгібування окисного стресу/p-NF-κB p65 і p-p38 MAPK/miR-21, продемонстрованого у нашій роботі, що узгоджується з даними Das et al. (2020), які запропонували цей ренопротекторний шлях EMPA. Більше того, стимуляція miR-21 була пов'язана зі зниженням механічних порогів та часу до відсмикування кінцівки під впливом тепла, як це було задокументовано у випадку ушкодження збережених нервів, що сприяло нейропатичному болю (Karl et al., 2017). Цей ефект скасовувався при введенні EMPA.

У сукупності всі корисні ефекти, спричинені EMPA, майже скасовувались під дією DORS - антагоніста AMPK, що підкреслює важливість участі AMPK у лікуванні ДПН як перспективного потенційного засобу.

На заключення, інгібітор НЗКТГ-2 EMPA може бути перспективним потенційним засобом для лікування не лише ДПН, але й нейропатичного болю в цілому. На додаток до протидіабетичного ефекту EMPA, він покращував ДПН та пов'язані симптоми. Нейропротекторні ефекти EMPA можуть бути опосередковані модуляцією сигнальних шляхів: AMPK/p38 MAPK/ERK1/2/ NF-κB p65/медіаторів запалення, AMPK/p38 MAPK/ miR-21/RECK/металопротеїназ або AMPK/mTOR, віддаючи належне активації AMPK у лікуванні ДПН. Це дослідження має деякі обмеження, які слід враховувати. Ми вивчали нейропротекторний вплив EMPA при периферичній нейропатії на моделі індукованого STZ ЦД 2 типу у щурів, тож необхідні додаткові експерименти на різних моделях болю, щоб перевірити його ефективність проти інших типів нейропатичного болю. Крім того, у цьому дослідженні вивчали потенційний механізм EMPA у стримуванні ДПН шляхом цільової дії на AMPK.

Таким чином, необхідні додаткові експерименти in vitro та/або in vivo для ретельного дослідження точних основних механізмів з використанням різних блокаторів для можливих шляхів нижчого рівня. З іншого боку, дане дослідження є першим, що повідомляє про ефективність EMPA проти ДПН на моделі ЦД 2-го типу у щурів, а також розглядає деякі можливі основні медіатори та сигнальні шляхи. Кілька недавніх досліджень показали, що EMPA полегшує периферичну нейропатію на експериментальних моделях ЦД 1-го типу, без визначення точних механізмів, хоча інгібітори НЗКТГ-2 наразі не схвалені для лікування ЦД 1-го типу (Lee et al. 2018; Eid et al. 2020).

Подяки

Автори висловлюють подяку Д-ру Мохамеду Абдельразеку (Каїрський університет, Факультет ветеринарної медицини) за проведення гістопатологічних досліджень. Автори також висловлюють подяку Д-ру Лайлі Рашед (Каїрський університет, Медичний факультет) за проведення кількісного аналізу ПЛР у реальному часі та Вестерн-бловтингу. Також висловлюється подяка Science Shake (www.scienceshake.com) за вичитку та редагування статті англійською мовою.

Фінансування

Фінансування відкритого доступу надається фондом The Science, Technology & Innovation Funding Authority (STDF) у співпраці з The Egyptian Knowledge Bank (EKB). Інше фінансування відсутнє.

Конфлікт інтересів

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Вперше опубліковано: *Abdelkader NF, Elbaset MA, Moustafa PE, Ibrahim SM. Empagliflozin mitigates type 2 diabetes-associated peripheral neuropathy: a glucose-independent effect through AMPK signaling. Arch Pharm Res. 2022 Jul;45(7):475-493. doi: 10.1007/s12272-022-01391-5. Epub 2022 Jun 29. PMID: 35767208; PMCID: PMC9325846.*

Опубліковано згідно з міжнародною ліцензією Creative Commons Attribution 4.0. Копія цієї ліцензії доступна за посиланням: http://creativecommons.Org/licenses/by/4.0/.

Література

1. Abdelhamid AM, Youssef ME, Abd El-Fattah EE, Gobba NA, Gaafar AGA, Girgis S, Shata A, Hafez AM, El-Ahwany E, Amin NA, Shahien MA, Abd-Eldayem MA, Abou-Elrous M, Saber S (2021) Blunting p38 MAPKα and ERK1/2 activities by empagliflozin enhances the antifibrotic effect of metformin and augments its AMPK-induced NF-κB inactivation in mice intoxicated with car- bon tetrachloride. Life Sci 286:120070. https://doi.org/10.1016/j. lfs.2021.120070
2. Abdelkader NF, Saad MA, Abdelsalam RM (2017) Neuroprotective effect of nebivolol against cisplatin-associated depressive-like behavior in rats. J Neurochem 141:449–460. https://doi.org/10. 1111/jnc.13978
3. Abdelkader NF, Ibrahim SM, Moustafa PE, Elbaset MA (2022) Inosine mitigated diabetic peripheral neuropathy via modulating GLO1/ AGEs/RAGE/NF-κB/Nrf2 and TGF-β/ PKC/TRPV1 signaling pathways. Biomed Pharmacother 145:112395. https://doi.org/10. 1016/j.biopha.2021.112395
4. Fernyhough P, Schmidt RE (2002) Neurofilaments in diabetic neuropathy. Int Rev Neurobiol 50:115–144. https://doi.org/10.1016/ s0074-7742(02)50075-1
5. Fontanesi LB, Fazan FS, Dias FJ, Schiavoni MCL, Marques W Jr, Fazan VPS (2019) Sensory and motor conduction velocity in spontaneously hypertensive rats: sex and aging investigation. Front Syst Neurosci 13:62. https://doi.org/10.3389/ fnsys.2019. 00062
6. Gembardt F, Bartaun C, Jarzebska N, Mayoux E, Todorov VT, Hohenstein B, Hugo C (2014) The SGLT2 inhibitor empagliflozin ameliorates early features of diabetic nephropathy in BTBR ob / ob type 2 diabetic mice with and without hypertension. Am J Physiol Physiol 307:F317–F325. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00145. 2014
7. Grempler R, Thomas L, Eckhardt M, Himmelsbach F, Sauer A, Sharp DE, Bakker RA, Mark M, Klein T, Eickelmann P (2012) Empagliflozin, a novel selective sodium glucose cotransporter-2 (SGLT- 2) inhibitor: characterisation and comparison with other SGLT-2 inhibitors. Diabetes Obes Metab 14:83–90. https://doi.org/10. 1111/j.1463-1326.2011.01517.x
8. Hasanvand A, Amini-Khoei H, Jahanabadi S, Hadian MR, Abdollahi A, Tavangar SM, Mehr SE, Dehpour AR (2018) Metformin attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats through activation of AMPK signaling pathway. J Nephropathol 7:37–42. https://doi.org/10.15171/jnp.2018.11
9. Hawley SA, Gadalla AE, Olsen GS, Grahame Hardie D (2002) The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. Diabetes 51:2420–2425. https://doi.org/10.2337/ diabetes.51.8.2420
10. Hawley SA, Ford RJ, Smith BK, Gowans GJ, Mancini SJ, Pitt RD, Day EA, Salt IP, Steinberg GR, Hardie DG (2016) The Na+/ glucose cotransporter inhibitor canagliflozin activates AMPK by inhibiting mitochondrial function and increasing cellular AMP levels. Diabetes 65:2784–2794. https://doi.org/10.2337/ db16-0058
11. He WY, Zhang B, Zhao WC, He J, Zhang L, Xiong QM, Wang J, Wang HB (2019) Contributions of mTOR activation-mediated upregulation of synapsin II and neurite outgrowth to hyperalgesia in STZ-induced diabetic rats. ACS Chem Neurosci 10:2385–2396. https://doi.org/10.1021/ acschemneuro.8b00680
12. Ibrahim WW, Ismail HM, Khattab MM, Abdelkader NF (2020) Cognitive enhancing effect of diapocynin in D-galactose-ovariectomy- induced Alzheimer's-like disease in rats: role of ERK, GSK-3β, and JNK signaling. Toxicol Appl Pharmacol 398:115028. https:// doi.org/10.1016/j.taap.2020.115028
13. Ibrahim WW, Kamel AS, Wahid A, Abdelkader NF (2022) Dapagliflozin as an autophagic enhancer via LKB1/AMPK/ SIRT1 pathway in ovariectomized/D-galactose Alzheimer's rat model. Inflammop- harmacol. https://doi.org/10.1007/ s10787-022-00973-5
14. Jensen TS, Finnerup NB (2014) Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. Lancet Neu- rol 13:924–935. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70102-4
15. Ji RR, Suter MR (2007) p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. Mol Pain 3:33. https://doi.org/10.1186/ 1744-8069-3-33
16. Jin SX, Zhuang ZY, Woolf CJ, Ji RR (2003) p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. J Neurosci 23:4017–4022. https://doi.org/10.1523/ jneurosci.23-10-04017.2003
17. Kamel AS, Mohamed AF, Rabie MA, Elsherbiny ME, Ahmed KA, Khattab MM, Abdelkader NF (2022) Experimental evidence for diiodohydroxyquinoline-induced neurotoxicity: characterization of age and gender as predisposing factors. Pharmaceuticals 15:251. https://doi.org/10.3390/ph15020251
18. Karl F, Grießhammer A, Üçeyler N, Sommer C (2017) Differential impact of miR-21 on pain and associated affective and cognitive behavior after spared nerve injury in B7–H1 ko mouse. Front Mol Neurosci 10:219. https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00219
19. Khdour MR (2020) Treatment of diabetic peripheral neuropathy: a review. J Pharm Pharmacol 72:863–872. https://doi.org/10.1111/ jphp.13241
20. Kovacs CS, Seshiah V, Swallow R, Jones R, Rattunde H, Woerle HJ, Broedl UC, EMPA-REG PIOTM trial investigators (2014) Empagliflozin improves glycaemic and weight control as add-on therapy to pioglitazone or pioglitazone plus metformin in patients with type 2 diabetes: a 24-week, randomized, placebo-controlled trial. Diabetes Obes Metab 16:147–158. https://doi.org/10.1111/dom. 12188
21. Koyani CN, Plastira I, Sourij H, Hallström S, Schmidt A, Rainer PP, Bugger H, Frank S, Malle E, von Lewinski D (2020) Empagliflozin protects heart from inflammation and energy depletion via AMPK activation. Pharmacol Res 158:104870. https://doi.org/10. 1016/j.phrs.2020.104870
22. Krakauer T (2004) Molecular therapeutic targets in inflammation: cyclooxygenase and NF-κB. Curr Drug Targets Inflamm Allergy 3:317–324. https://doi.org/10.2174/1568010043343714
23. Lederman RJ (2012) Bradley's neurology in clinical practice. JAMA 308:1694. https://doi.org/10.1001/jama.308.16.1694-a
24. Lee KA, Jin HY, Lee NY, Kim YJ, Park TS (2018) Effect of empagliflozin, a selective sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor, on kidney and peripheral nerves in streptozotocin-induced diabetic rats. Diabetes Metab J 42:338–342. https://doi.org/10.4093/dmj. 2017.0095
25. Lee YH, Kim SH, Kang JM, Heo JH, Kim DJ, Park SH, Sung M, Kim J, Oh J, Yang DH, Lee SH, Lee SY (2019) Empagliflozin attenuates diabetic tubulopathy by improving mitochondrial fragmentation and autophagy. Am J Physiol Renal Physiol 317:F767–F780. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00565.2018
26. Leighton GE, Rodriguez RE, Hill RG, Hughes J (1988) κ-Opioid agonists produce antinociception after i.v. and i.c.v. but not intrathecal administration in the rat. Br J Pharmacol 93:553–560. https://doi. org/10.1111/j.1476-5381.1988.tb10310.x
27. Lin CH, Cheng YC, Nicol CJ, Lin KH, Yen CH, Chiang MC (2017) Activation of AMPK is neuroprotective in the oxidative stress by advanced glycosylation end products in human neural stem cells. Exp Cell Res 359:367–373. https://doi.org/10.1016/j.yexcr. 2017.08.019
28. Ling D, Luo J, Wang M, Cao X, Chen X, Fang K, Yu B (2019) Kilo-hertz high-frequency alternating current blocks nerve conduction without causing nerve damage in rats. Ann Transl Med 7:661– 661. https://doi.org/10.21037/atm.2019.10.36
29. Liu SY, Chen L, Li XC, Hu QK, He LJ (2018) Lycium barbarum poly-saccharide protects diabetic peripheral neuropathy by enhancing autophagy via mTOR/p70S6K inhibition in streptozotocin- induced diabetic rats. J Chem Neuroanat 89:37–42. https://doi. org/10.1016/j.jchemneu.2017.12.011
30. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. Methods 25:402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262
31. LuQ,LiuJ,LiX,SunX,ZhangJ,RenD,TongN,LiJ(2020) Empagliflozin attenuates ischemia and reperfusion injury through LKB1/AMPK signaling pathway. Mol Cell Endocrinol 501:110642. https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110642
32. Lundblad M, Vaudano E, Cenci MA (2003) Cellular and behavioural effects of the adenosine A2a receptor antagonist KW-6002 in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia. J Neurochem 84:1398– 1410. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01632.x

33. Mabley JG, Rabinovitch A, Suarez-Pinzon W, Haskó G, Pacher P, Power R, Southan G, Salzman A, Szabó C (2003) Inosine protects against the development of diabetes in multiple-low-dose strepto- zotocin and nonobese diabetic mouse models of type 1 diabetes. Mol Med 9:96–104. https://doi.org/10.2119/2003-00016.mabley
34. Milligan ED, Watkins LR (2009) Pathological and protective roles of glia in chronic pain. Nat Rev Neurosci 10:23–36. https://doi.org/ 10.1038/nrn2533
35. Mohamed MAE, Abdel-Rahman RF, Mahmoud SS, Khattab MM, Safar MM (2020) Metformin and trimetazidine ameliorate diabe- tes-induced cognitive impediment in status epileptic rats. Epilepsy Behav 104:106893. https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.106893
36. Moustafa PE, Abdelkader NF, El Awdan SA, El-Shabrawy OA, Zaki HF (2018a) Extracellular matrix remodeling and modulation of inflammation and oxidative stress by sulforaphane in experimen- tal diabetic peripheral neuropathy. Inflammation 41:1460–1476. https://doi.org/10.1007/s10753-018-0792-9
37. Moustafa PE, Abdelkader NF, El Awdan SA, El-Shabrawy OA, Zaki HF (2018b) Liraglutide ameliorated peripheral neuropathy in diabetic rats: involvement of oxidative stress, inflammation and extra- cellular matrix remodeling. J Neurochem 146:173–185. https:// doi.org/10.1111/jnc.14336
38. Najafi R, Hosseini A, Ghaznavi H, Mehrzadi S, Sharifi AM (2017) Neuroprotective effect of cerium oxide nanoparticles in a rat model of experimental diabetic neuropathy. Brain Res Bull 131:117–122. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.03.013
39. Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M (2000a) The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. Kidney Int 58:S26–S30. https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.07705.x
40. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M (2000b) Normalizing mitochondrial superoxide pro- duction blocks three pathways of hyperglycaemic damage. Nature 404:787–790. https://doi.org/10.1038/35008121
41. Obata K, Noguchi K (2004) MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. Life Sci 74:2643–2653. https://doi.org/ 10.1016/j.lfs.2004.01.007
42. Obrosova IG (2002) How does glucose generate oxidative stress in peripheral nerve? Int Rev Neurobiol 50:3–35. https://doi.org/10. 1016/s0074-7742(02)50071-4
43. Owen MR, Doran E, Halestrap AP (2000) Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. Biochem J 348:607–614. https://doi.org/10.1042/0264-6021:3480607
44. Packer M, Anker SD, Butler J, Filippatos G, Zannad F (2017) Effects of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors for the treatment of patients with heart failure. JAMA Cardiol 2:1025. https://doi.org/ 10.1001/jamacardio.2017.2275
45. Pittayapruek P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M (2016) Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis. Int J Mol Sci 17:868. https://doi.org/10.3390/ ijms17060868
46. Roy Chowdhury SK, Smith DR, Saleh A, Schapansky J, Marquez A, Gomes S, Akude E, Morrow D, Calcutt NA, Fernyhough P (2012) Impaired adenosine monophosphate-activated protein kinase signalling in dorsal root ganglia neurons is linked to mitochondrial dysfunction and peripheral neuropathy in diabetes. Brain 135:1751–1766. https://doi.org/10.1093/brain/aws097
47. Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang YY, Kim J, Kim H, Neufeld TP, Dillin A, Guan KL (2013) ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. Nat Cell Biol 15:741–750. https://doi.org/10.1038/ncb2757
48. Sadosky A, Mardekian J, Parsons B, Hopps M, Bienen EJ, Markman J (2015) Healthcare utilization and costs in diabetes relative to the clinical spectrum of painful diabetic peripheral neuropathy. J N. F. Abdelkader et al. Diabetes Complicat 29:212–217. https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2014.10.013
49. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, Colagiuri S, Guariguata L, Motala AA, Ogurtsova K, Shaw JE, Bright D, Williams R (2019) Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. Diabetes Res Clin Pract 157:107843. https://doi.org/ 10.1016/j.diabres.2019.107843
50. Schäfers M, Svensson CI, Sommer C, Sorkin LS (2003) Tumor necrosis factor-α induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. J Neuro- sci 23:2517–2521. https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-07-02517. 2003
51. Scott LJ (2014) Empagliflozin: a review of its use in patients with type 2 Diabetes Mellitus. Drugs 74:1769–1784. https://doi.org/ 10.1007/s40265-014-0298-1
52. Sharma AK, Sharma A, Kumari R, Kishore K, Sharma D, Srinivasan BP, Sharma A, Singh SK, Gaur S, Jatav VS, Sharma P, Srivas- tava V, Joshi S, Joshi M, Dhakad PK, Kanawat DS, Mishra A, Sharma A, Singh D, Singh RP, Chawda HS, Singh R, Raikwar SK, Kurmi MK, Khatri P, Agarwal A, Munajjam A (2012) Sitagliptin, sitagliptin and metformin, or sitagliptin and amitriptyline attenu- ate streptozotocin-nicotinamide induced diabetic neuropathy in rats. J Biomed Res 26:200–210. https://doi.org/10.7555/JBR.26. 20110054
53. Shrikanth CB, Nandini CD (2020) AMPK in microvascular complica- tions of diabetes and the beneficial effects of AMPK activators from plants. Phytomedicine 73:152808. https://doi.org/10.1016/j. phymed.2018.12.031
54. Singh J, Aditya S, Lal H, Arora B (2011) Effect of lacidipine pretreatment on diabetic neuropathy in rats. Arch Physiol Biochem 117:12–17. https://doi.org/10.3109/13813455.2010.525241
55. SunX,HanF,LuQ,LiX,RenD,ZhangJ,HanY,XiangYK,Li J (2020) Empagliflozin ameliorates obesity-related cardiac dysfunction by regulating sestrin2-mediated ampkmtor signaling and redox homeostasis in high-fat diet–induced obese mice. Diabetes 69:1292–1305. https://doi.org/10.2337/db19-0991
56. Tsuda M, Mizokoshi A, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Inoue K (2004) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. Glia 45:89–95. https://doi.org/ 10.1002/glia.10308
57. Verma S, Rawat S, Ho KL, Wagg CS, Zhang L, Teoh H, Dyck JE, Uddin GM, Oudit GY, Mayoux E, Lehrke M, Marx N, Lopaschuk GD (2018) Empagliflozin increases cardiac energy production in diabetes: novel translational insights into the heart failure benefits of SGLT2 inhibitors. JACC Basic Transl Sci 3:575–587. https:// doi.org/10.1016/j.jacbts.2018.07.006
58. Vincent AM, Brownlee M, Russell JW (2002) Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. Ann N Y Acad Sci 959:368–383. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb021 08.x
59. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL (2004) Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. Endocr Rev 25:612– 628. https://doi.org/10.1210/er.2003-0019
60. Visnagri A, Kandhare AD, Shiva Kumar V, Rajmane AR, Mohammad A, Ghosh P, Ghule AE, Bodhankar SL (2012) Elucidation of ameliorative effect of Co-enzyme Q10 in streptozotocin-induced diabetic neuropathic perturbation by modulation of electrophysiological, biochemical and behavioral markers. Biomed Aging Pathol 2:157–172. https://doi.org/10.1016/j.biomag.2012.10.006
61. Wang R, Wang L, Zhang C, Zhang Y, Liu Y, Song L, Ma R, Dong J (2018) L-carnitine ameliorates peripheral neuropathy in diabetic mice with a corresponding increase in insulin-like growth factor-1 level. Mol Med Rep 19:743–751. https://doi.org/10.3892/mmr. 2018.9647
62. Xiang HC, Lin LX, Hu XF, Zhu H, Li HP, Zhang RY, Hu L, Liu WT, Zhao YL, Shu Y, Pan HL, Li M (2019) AMPK activation attenuates inflammatory pain through inhibiting NF-κB activation and IL-1β expression. J Neuroinflamm 16:34. https://doi.org/10.1186/ s12974-019-1411-x
63. Xie Z, Lau K, Eby B, Lozano P, He C, Pennington B, Li H, Rathi S, Dong Y, Tian R, Kem D, Zou MH (2011) Improvement of cardiac functions by chronic metformin treatment is associated with enhanced cardiac autophagy in diabetic OVE26 mice. Diabetes 60:1770–1778. https://doi.org/10.2337/db10-0351
64. Yerra VG, Kumar A (2017) Adenosine monophosphate-activated protein kinase abates hyperglycaemia-induced neuronal injury in experimental models of diabetic neuropa-

thy: effects on mitochon- drial biogenesis, autophagy and neuroinflammation. Mol Neurobiol 54:2301–2312. https://doi.org/10.1007/s12035-016-9824-3
65. Zan Y, Kuai CX, Qiu ZX, Huang F (2017) Berberine ameliorates dia- betic neuropathy: TRPV1 modulation by PKC pathway. Am J Chin Med 45:1709–1723. https://doi.org/10.1142/S0192415X1 7500926
66. Zangiabadi N, Asadi-Shekaari M, Sheibani V, Jafari M, Shabani M, Asadi AR, Tajadini H, Jarahi M (2011) Date fruit extract is a neuroprotective agent in diabetic peripheral neuropathy in strep- tozotocin-induced diabetic rats: a multimodal analysis. Oxid Med Cell Longev 2011:1–9. https://doi.org/10.1155/2011/976948
67. Zangiabadi N, Mohtashami H, Hojatipour M, Jafari M, Asadi-Shekaari M, Shabani M (2014) The effect of angipars on diabetic neuropathy in STZ-induced diabetic male rats: a study on behavioral, electrophysiological, sciatic histological and ultrastructural indices. Sci World J 2014:1–8. https://doi.org/10.1155/2014/721547
68. Zelniker TA, Wiviott SD, Raz I, Im K, Goodrich EL, Bonaca MP, Mosenzon O, Kato ET, Cahn A, Furtado RHM, Bhatt DL, Leiter LA, McGuire DK, Wilding JPH, Sabatine MS (2019) SGLT2 inhibitors for primary and secondary prevention of cardiovascular and renal outcomes in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cardiovascular outcome trials. The Lancet 393:31–39. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32590-X
69. Zhou Y, Wu W (2017) The sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor, empagliflozin, protects against diabetic cardiomyopathy by inhibition of the endoplasmic reticulum stress pathway. Cell Physiol Biochem 41:2503–2512. https://doi.org/10.1159/000475942
70. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. J Clin Invest 108:1167–1174. https://doi.org/10.1172/JCI13505
71. Zhou H, Wang S, Zhu P, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE (2018) Empagliflozin rescues diabetic myocardial microvascular injury via AMPK-mediated inhibition of mitochondrial fission. Redox Biol 15:335–346. https://doi.org/10.1016/j. redox.2017.12.019
72. Zhuang ZY, Gerner P, Woolf CJ, Ji RR (2005) ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. Pain 114:149–159. https://doi.org/10.1016/j. pain.2004.12.022

Empagliflozin mitigates type 2 diabetes-associated peripheral neuropathy: a glucose-independent effect through AMPK signaling

Noha F. Abdelkader, Marawan A. Elbaset, Passant E. Moustafa, Sherehan M. Ibrahim

Abstract

Abstract Diabetic peripheral neuropathy (DPN) represents a severe microvascular condition that dramatically affects diabetic patients despite adequate glycemic control, result-ing in high morbidity. Thus, recently, anti-diabetic drugs that possess glucose-independent mechanisms attracted attention. This work aims to explore the potentiality of the selective sodium-glucose cotransporter-2 inhibitor, empagli-flozin (EMPA), to ameliorate streptozotocin-induced DPN in rats with insight into its precise signaling mechanism. Rats were allocated into four groups, where control animals received vehicle daily for 2 weeks. In the remaining groups, DPN was elicited by single intraperitoneal injections of freshly prepared streptozotocin and nicotinamide (52.5 and 50 mg/kg, respectively). Then EMPA (3 mg/kg/p.o.) was given to two groups either alone or accompanied with the AMPK inhibitor dorsomorphin (0.2 mg/kg/i.p.). Despite the non-significant anti-hyperglycemic effect, EMPA improved sciatic nerve histopathological alterations, scoring, myeli-nation, nerve fibers' count, and nerve conduction velocity. Moreover, EMPA alleviated responses to different nocicep-tive stimuli along with improved motor coordination. EMPA modulated ATP/AMP ratio, upregulated p-AMPK while reducing p-p38 MAPK expression, p-ERK1/2 and conse-quently p-NF-κB p65 as well as its downstream mediators (TNF-α and IL-1β), besides enhancing SOD activity and lowering MDA content. Moreover, EMPA downregulated mTOR and stimulated ULK1 as well as beclin-1. Likewise, EMPA reduced miR-21 that enhanced RECK, reducing MMP-2 and -9 contents. EMPA's beneficial effects were almost abolished by dorsomorphin administration. In con-clusion, EMPA displayed a protective effect against DPN independently from its anti-hyperglycemic effect, probably via modulating the AMPK pathway to modulate oxidative and inflammatory burden, extracellular matrix remodeling, and autophagy.

Keywords: Empagliflozin, Dorsomorphin, Diabetic peripheral neuropathy, AMPK, p38 MAPK, mTOR.