



УДК: 577.17

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-1-41-57>

## Интраназально вводимый инсулин, но не С-пептид проинсулина, нормализует гормональные показатели и экспрессию гипоталамических генов у самцов крыс с диабетом 2-го типа и ожирением

К. В. Деркач<sup>✉1</sup>, А. А. Бахтюков<sup>1</sup>, Н. Е. Басова<sup>1</sup>, В. М. Бондарева<sup>1</sup>, А. О. Шпаков<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, 194223, Россия, г. Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44

### Сведения об авторах

Кира Викторовна Деркач, SPIN-код: 6925-1558, Scopus AuthorID: 6603743572, ResearcherID: AAN-1060-2020, ORCID: 0000-0001-6555-9540, e-mail: [derkatch\\_k@list.ru](mailto:derkatch_k@list.ru)

Андрей Андреевич Бахтюков, SPIN-код: 7073-0586, Scopus AuthorID: 57191163820, ResearcherID: AAN-1834-2020, ORCID: 0000-0002-2060-2020, e-mail: [bahtyukov@gmail.com](mailto:bahtyukov@gmail.com)

Наталья Евгеньевна Басова, SPIN-код: 7047-8940, Scopus AuthorID: 7004372495, ResearcherID: AAN-2150-2020, ORCID: 0000-0002-7316-2882, e-mail: [basovnat@mail.ru](mailto:basovnat@mail.ru)

Вера Михайловна Бондарева, SPIN-код: 1896-0263, Scopus AuthorID: 7005696695, ResearcherID: T-6906-2017, ORCID: 0000-0002-3761-1222, e-mail: [bondver@mail.ru](mailto:bondver@mail.ru)

Александр Олегович Шпаков, SPIN-код: 6335-8311, Scopus AuthorID: 35231150500, ResearcherID: R-6581-2016, ORCID: 0000-0002-4293-3162, e-mail: [alex\\_shpakov@list.ru](mailto:alex_shpakov@list.ru)

**Для цитирования:** Деркач, К. В., Бахтюков, А. А., Басова, Н. Е., Бондарева, В. М., Шпаков, А. О. (2022) Интраназально вводимый инсулин, но не С-пептид проинсулина, нормализует гормональные показатели и экспрессию гипоталамических генов у самцов крыс с диабетом 2-го типа и ожирением. *Интегративная физиология*, т. 3, № 1, с. 41–57. <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-1-41-57>

**Получена** 27 января 2022; прошла рецензирование 9 марта 2022; принята 10 марта 2022.

**Финансирование:** Работа выполнена в рамках государственного задания ИЭФБ РАН № 075-0152-22-00.

**Права:** © К. В. Деркач, А. А. Бахтюков, Н. Е. Басова, В. М. Бондарева, А. О. Шпаков (2022). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

**Аннотация.** Сахарный диабет 2-го типа (СД2) характеризуется нарушениями в сигнальных системах мозга, в том числе регулируемых инсулином. Для восстановления инсулиновой сигнализации в мозге может быть применен интраназально вводимый инсулин (ИИ). Эффективность ИИ, как показано нами ранее при СД1 и инсулинодефицитном СД2, повышается при совместном применении с интраназально вводимым С-пептидом (ИС). Целью работы было изучить влияние 9-дневного лечения крыс с диет-индуцированным СД2 с ожирением и гиперинсулинемией с помощью ИИ (0,5 МЕ/крысу/сутки) и его комбинации с ИС (36 мкг/крысу/сутки) на метаболические показатели, базальные и стимулированные глюкозой уровни инсулина, адипокинов, глюкагоноподобного пептида-1, грелина, гормональный статус тиреоидной и гонадной систем, уровни инсулина и лептина в гипоталамусе и экспрессию гипоталамических генов, кодирующих рецепторы и пищевые факторы. Монотерапия ИИ нормализовала сниженный при СД2 уровень инсулина в гипоталамусе, улучшала глюкозный гомеостаз, тиреоидный статус, ответы инсулина, лептина и инкретинов на глюкозу, восстанавливала экспрессию гипоталамических генов проопиомеланокортина и М4-меланокортинового рецептора, опосредующих снижение аппетита, и снижала экспрессию гена орексигенного нейропептида Y. Совместное применение ИИ и ИС не усиливало эффекты ИИ. Монотерапия ИС была неэффективной и даже усугубляла метаболические показатели. Таким образом, у крыс с СД2 и гиперинсулинемией ИИ улучшал метаболические и гормональные показатели, что обусловлено нормализацией сниженного в результате ослабления рецептор-опосредуемого транспорта через гематоэнцефалический барьер уровня инсулина в мозге, в то время как ИС, в том числе в комбинации с ИИ, оказался неэффективным.

**Ключевые слова:** инсулин, С-пептид проинсулина, интраназальное введение, диабет 2 типа, ожирение, гиперинсулинемия, гипоталамус, лептин, глюкозотолерантность, тиреоидный статус

# Insulin administered intranasally, but not proinsulin C-peptide, normalises hormonal parameters and hypothalamic gene expression in male rats with type 2 diabetes and obesity

K. V. Derkach<sup>✉1</sup>, A. A. Bakhtyukov<sup>1</sup>, N. E. Basova<sup>1</sup>, V. M. Bondareva<sup>1</sup>, A. O. Shpakov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, 44 Thoreza Ave., Saint Petersburg 194223, Russia

## Authors

Kira V. Derkach, SPIN: 6925-1558, Scopus AuthorID: 6603743572, ResearcherID: [AAN-1060-2020](https://orcid.org/0000-0001-6555-9540),  
ORCID: [0000-0001-6555-9540](https://orcid.org/0000-0001-6555-9540), e-mail: [derkach\\_k@list.ru](mailto:derkach_k@list.ru)

Andrey A. Bakhtyukov, SPIN: 7073-0586, Scopus AuthorID: 57191163820, ResearcherID: [AAN-1834-2020](https://orcid.org/0000-0002-2060-2020),  
ORCID: [0000-0002-2060-2020](https://orcid.org/0000-0002-2060-2020), e-mail: [bahtyukov@gmail.com](mailto:bahtyukov@gmail.com)

Natalia E. Basova, SPIN: 7047-8940, Scopus AuthorID: 7004372495, ResearcherID: [AAN-2150-2020](https://orcid.org/0000-0002-7316-2882),  
ORCID: [0000-0002-7316-2882](https://orcid.org/0000-0002-7316-2882), e-mail: [basovnat@mail.ru](mailto:basovnat@mail.ru)

Vera M. Bondareva, SPIN: 1896-0263, Scopus AuthorID: 7005696695, ResearcherID: [T-6906-2017](https://orcid.org/0000-0002-3761-1222),  
ORCID: [0000-0002-3761-1222](https://orcid.org/0000-0002-3761-1222), e-mail: [bondver@mail.ru](mailto:bondver@mail.ru)

Alexander O. Shpakov, SPIN: 6335-8311, Scopus AuthorID: 35231150500, ResearcherID: [R-6581-2016](https://orcid.org/0000-0002-4293-3162),  
ORCID: [0000-0002-4293-3162](https://orcid.org/0000-0002-4293-3162), e-mail: [alex\\_shpakov@list.ru](mailto:alex_shpakov@list.ru)

**For citation:** Derkach, K. V., Bakhtyukov, A. A., Basova, N. E., Bondareva, V. M., Shpakov, A. O.

(2022) Insulin administered intranasally, but not proinsulin C-peptide, normalises hormonal parameters and hypothalamic gene expression in male rats with type 2 diabetes and obesity. *Integrative Physiology*, vol. 3, no. 1, pp. 41–57.

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2022-3-1-41-57>

**Received** 27 January 2022; reviewed 9 March 2022; accepted 10 March 2022.

**Funding:** The study was supported by the State Assignment No. 075-0152-22-00.

**Copyright:** © K. V. Derkach, A. A. Bakhtyukov, N. E. Basova, V. M. Bondareva, A. O. Shpakov (2022). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under [CC BY-NC License 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

**Abstract.** Type 2 diabetes mellitus (DM2) is characterised by changes in brain signalling systems, including those regulated by insulin. Intranasally administered insulin (II) can be used to restore brain insulin signalling. The effectiveness of II, as we have shown earlier in DM1 and insulin-deficient DM2, increases when combined with intranasally administered C-peptide (IC). The aim of this work was to study the effect of a 9-day treatment of rats with diet-induced DM2, obesity and hyperinsulinemia with II (0.5 IU/rat/day) and combined II and IC (36 µg/rat/day) on rats' metabolic parameters, basal and glucose-stimulated levels of insulin, adipokines, glucagon-like peptide-1 and ghrelin, hormonal status of the thyroid and gonadal systems, intrahypothalamic insulin and leptin levels, and expression of hypothalamic genes encoding receptors and nutritional factors. II monotherapy normalised hypothalamic insulin levels lowered in DM2, improved glucose homeostasis, thyroid status and insulin, leptin and incretin responses to glucose, restored the expression of hypothalamic proopiomelanocortin and M4-melanocortin receptor genes responsible for reducing appetite, and reduced the gene expression of orexigenic neuropeptide Y. The combined use of II and IC did not improve the effect of II. IC monotherapy was ineffective and even worsened subject metabolic parameters. Thus, in DM2 rats with hyperinsulinemia, II improved metabolic and hormonal parameters. This is due to normalisation of the brain insulin levels that had been reduced as a result of weaker receptor-mediated transport of insulin across the blood-brain barrier. IC, however, was ineffective, including in combination with II.

**Keywords:** insulin, proinsulin C-peptide, intranasal administration, type 2 diabetes, obesity, hyperinsulinemia, hypothalamus, leptin, glucose tolerance, thyroid status

## Введение

В настоящее время отмечается значительный рост заболеваемости сахарным диабетом 2-го типа (СД2), распространение которого приобретает характер эпидемии (Serbis et al. 2021). Однако используемые подходы для лечения СД2 и предотвращения его осложнений со стороны сердечно-сосудистой, нервной, вы-

делительной и эндокринной систем до сих пор имеют низкую эффективность, несмотря на большое число применяемых для коррекции СД2 фармакологических препаратов и стратегий, большинство из которых включают повышение физической активности и нормализацию пищевого поведения (Sciacqua et al. 2021; Shen, Greenberg, 2021). Наряду с нарушенной толерантностью к глюкозе одним из основных признаков СД2 является инсулиновая резистентность, пред-

ставляющая собой ослабление ответа тканевой мишеней на инсулин и развивающаяся вследствие снижения чувствительности к инсулину его рецепторов и функциональных нарушений в пострецепторных звеньях инсулиновой сигнальной системы (Lee et al. 2022). На ранних стадиях развития СД2 инсулиновая резистентность сочетается с гиперинсулинемией, которая начинает ослабляться, как правило, при длительном течении СД2, когда снижается инсулин-продуцирующая функция панкреатических  $\beta$ -клеток (Al-Mrabeh 2021; Wysham, Shubrook 2020).

В условиях гиперинсулинемии уровень инсулина на периферии повышен, но его поступление в мозг, через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), представляющее собой рецептор-опосредуемый процесс, затруднено, и это может приводить к дефициту инсулина в ЦНС. Ранее нами было показано, что у крыс и мышей с диет-индуцированным или генетически обусловленным ожирением, несмотря на повышение уровня инсулина в крови, его содержание в мозге снижено (Derkach et al. 2019; Romanova et al. 2018). В условиях ассоциированной с ожирением гиперлептинемии в мозге грызунов снижено и содержание лептина, который так же, как и инсулин, поступает в мозг рецептор-зависимым способом (Derkach et al. 2019). Инсулиновые и лептиновые пути в ЦНС тесно взаимосвязаны и имеют ряд общих внутриклеточных мишеней, наиболее важными из которых являются ферменты фосфатидилинозитол-3-киназа и Akt-киназа, вовлеченные в контроль выживаемости нейронов и нейродифференцировку (Huang et al. 2018; Scherer et al. 2021). Тем самым дефицит лептина вызывает ослабление инсулиновых путей, а дефицит инсулина, в свою очередь, негативно влияет на лептиновый сигналинг (Shpakov et al. 2015). Исходя из этого, при СД2 и других метаболических расстройствах перспективным является компенсация недостатка инсулина в ЦНС, для чего в наибольшей степени подходит интраназально вводимый инсулин (ИИ), что было ранее продемонстрировано нами при длительном лечении ИИ крыс с метаболическим синдромом и СД2 (Derkach et al. 2017; Sukhov et al. 2016). Наряду с этим была показана эффективность ИИ для улучшения памяти, метаболических и гормональных показателей у крыс с СД1 (Derkach et al. 2015; 2018a; 2018b; Sukhov et al. 2013), а также для предотвращения нейродегенерации при ишемии/реперфузии головного мозга у крыс (Zakharova et al. 2021). Следует отметить, что в клинике ИИ сейчас успешно используется для лечения па-

циентов с нарушениями когнитивных функций, в том числе с болезнью Альцгеймера, наркотической зависимостью, послеоперационными осложнениями, травмами головного мозга (Badenes et al. 2021; Kashyap et al. 2020; Lu, Xu 2019; Shaughnessy et al. 2020). Нейропротекторный эффект инсулина в мозге обусловлен его способностью подавлять апоптотические и воспалительные процессы в нейронах. Воздействуя на инсулинзависимые гипоталамические системы, ИИ нормализует пищевое поведение и функции эндокринной системы (Шпаков и др. 2019; Shpakov et al. 2015). Однако эффекты краткосрочного влияния ИИ на метаболические и гормональные показатели при экспериментальном СД2 не изучены, несмотря на то что сравнительно короткие курсы ИИ представляют наибольший интерес для клинической эндокринологии, будучи легко осуществимыми и не приводящими к развитию центральной инсулиновой резистентности.

В условиях гиперпродукции инсулина в крови повышается уровень С-пептида, продукта протеолитического расщепления проинсулина в  $\beta$ -клетках. Согласно современным представлениям, С-пептид образует комплексы с инсулином, уменьшая стабильность олигомерных инсулиновых комплексов и тем самым повышая доступность инсулина для рецепторов. Кроме того, С-пептид характеризуется собственной биологической активностью (Shpakov 2017). Нами ранее было показано, что интраназально вводимый С-пептид (ИС) при инсулинодефицитных формах СД (стрептозотоциновом СД1, неонатальном стрептозотоциновом СД2) при совместном применении с ИИ повышает эффективность его восстанавливающего действия на метаболические и гормональные показатели и функции эндокринной системы (Derkach et al. 2018a; 2018b; 2019a; 2019b). Имеются данные о перспективах применения фармакологических препаратов С-пептида для лечения пациентов с СД1 (Washburn et al. 2021). Однако сведения об использовании ИС при СД2, который сопровождается ожирением и гиперинсулинемией, отсутствуют. Мы предположили, что, как и в случае СД1 и неонатального СД2, совместное применение ИИ и ИС у крыс с диет-индуцированным СД2 усилит эффекты инсулина, реализуемые через центральные, в первую очередь гипоталамические, механизмы.

Целью работы было изучить влияние девятидневного лечения крыс с диет-индуцированным СД2 с ожирением и гиперинсулинемией с помощью ИИ и его комбинации с ИС на метаболические показатели, базальные и стиму-

лированные глюкозой уровни инсулина, адипокинов, инкретинов, гормональный статус тиреоидной и гонадной систем, а также на уровни инсулина и лептина в гипоталамусе и на экспрессию гипоталамических генов, кодирующих рецепторные белки и пищевые факторы.

### Методика

В экспериментах использовали самцов крыс линии Вистар, которых содержали в стандартных условиях вивария, на стандартном рационе, со свободным доступом к пище и воде. Все процедуры по уходу и использованию животных осуществляли в соответствии с требованиями Этического комитета ИЭФБ РАН (протокол № 2/2020), European Communities Council Directive 1986 (86/609/EEC) и Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

СД2 индуцировали длительной высокожировой диетой, которую самцы крыс получали в течение двух месяцев, с последующей обработкой животных низкой дозой (15 мг/кг) стрептозотоцина (Sigma, США) и продолжением диеты еще в течение четырех недель. Высокожировая диета включала потребление смеси, 1 кг которой содержал 524 г свиного сала, 417 г творога, 50 г печени, 5,3 г L-метионина, 1,85 г дрожжей, 1,85 г NaCl (Derkach et al. 2015). Контрольные крысы вместо высокожировой диеты получали стандартный корм, а вместо стрептозотоцина им вводили его растворитель — 0,1 М Na-цитратный буфер (pH 4,5). Перед началом лечения проводили оральный глюкозотолерантный тест (ОГТТ) и отбирали крыс с СД2, используя в качестве критериев повышение массы тела, уровень глюкозы в крови через 120 мин после глюкозной нагрузки выше 7 мМ и содержание гликированного гемоглобина (HbA1c) в крови выше 5,5%. Концентрацию глюкозы в крови оценивали с помощью тест-полосок One Touch Ultra (США) и глюкометра Life Scan Johnson & Johnson (Дания), а содержание HbA1c — с помощью набора Multi Test HbA1c System (Polymer Technology Systems, Inc., США). Образцы крови забирали из хвостовой вены под местным наркозом (2%-ный раствор лидокаина, 2–4 мг/кг). ОГТТ проводили после 6-часового лишения животных пищи, вводя через зонд 40%-ный раствор глюкозы (2 г/кг). Уровень глюкозы и гормонов в крови оценивали до глюкозной нагрузки и через 15, 30, 60 и 120 мин после нее.

После верификации СД2 диабетических крыс рандомизировали и формировали четыре груп-

пы (в каждой  $n = 6$ ) — диабет без лечения (группа Д), диабет с лечением ИИ (0,5 МЕ/крысу/сутки, 9 дней) (группа Д + ИИ), ИС (36 мкг/крысу/сутки, 9 дней) (группа Д + ИС) и совместно ИИ и ИС в тех же дозах (группа Д + ИИ + ИС). Контрольные животные ( $n = 6$ , группа К) вместо препаратов интраназально в том же объеме и в те же сроки получали их растворитель — физиологический раствор. Диабетические крысы на протяжении девятидневного эксперимента продолжали получать высокожировую диету, контрольные животные — стандартную кормовую смесь. На 7-й день эксперимента (после лишения пищи в течение 6 ч) повторно осуществляли ОГТТ, по результатам которого оценивали толерантность к глюкозе, а также гормональный ответ на глюкозную нагрузку. В течение первых шести дней оценивали потребление корма (в пересчете на килокалории). Динамику изменения уровня тестостерона в крови оценивали на 8-й день эксперимента, забирая кровь из хвостовой вены под местным наркозом. В последний (9-й) день эксперимента, через 3 ч после введения ИИ и ИС, крыс наркотизировали с помощью хлоральгидрата (в/б, 400 мг/кг), затем декапитировали, забирали образцы крови для определения гормонов и ткани гипоталамуса для определения уровней инсулина и лептина и оценки экспрессии целевых генов.

#### *Измерение уровня гормонов, лептина и инкретинов в крови*

Для измерения уровней инсулина, лептина, глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1), грелина, лютеинизирующего (ЛГ) и тиреотропного (ТТГ) гормонов в крови использовали иммуноферментные наборы Rat Insulin ELISA (Mercodia, Швеция); ELISA for Leptin, Rat; ELISA for GLP-1, Rat; ELISA for Ghrelin, Rat и ELISA for LH, Rat (Cloud-Clone Corp., США) и ELISA, Rat TSH (Cusabio Biotech Co., Ltd., КНР). Уровни свободного (fT4) и общего тироксина (tT4), свободного (fT3) и общего трийодтиронина (tT3) оценивали с помощью наборов фирмы «Иммунотех» (Россия), в то время как уровень тестостерона измеряли с использованием набора Testosterone-ELISA kit («Алкор-Био», Россия).

#### *Измерение уровня инсулина и лептина в гипоталамусе*

Для оценки содержания инсулина и лептина в гипоталамусе крыс образцы ткани гомогенизировали в соотношении 1:10 в лизирующем буфере, как описано ранее (Derkach et al. 2019). Лизирующий буфер содержал 20 мМ Трис-НСl

(рН 7,5), 150 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА, 2 мМ ЭГТА, 0,25 М сахарозу, 0,5% Triton X-100, 0,5% дезоксихолат натрия, 15 мМ фторид натрия, 10 мМ глицерофосфат натрия, 10 мМ пирофосфат натрия, 1 мМ орто-ванадат натрия, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид, 0,02% азид натрия и коктейль ингибиторов протеаз (Sigma-Aldrich, США). Полученный гомогенат центрифугировали (10 000 г, 5 мин), после чего в супернатанте измеряли концентрацию инсулина и лептина с помощью наборов Rat Insulin ELISA (Merckodia, Швеция) и ELISA for Leptin, Rat (Cloud-Clone Corp., США), соответственно.

#### Измерение экспрессии гипоталамических генов

Для изучения экспрессии генов в гипоталамусе крыс использовали количественную ПЦР с обратной транскрипцией, для чего из ткани гипоталамуса выделяли общую РНК, используя TRIzol Reagent (США), как описано ранее (Derkach et al. 2019). Для получения кодирующей ДНК использовали набор MMLV RT Kit («Евроген», Россия). Амплификацию проводили в смеси, содержащей 10 нг обратно транскрибированного продукта, по 0,4 мкМ прямого и обратного праймеров и среду qPCRmix-HS SYBR+LowROX («Евроген», Россия). Для детекции сигнала использовали амплификатор 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Для оценки экспрессии генов использовали следующие прямые (Forward) и обратные (Reverse) праймеры: (1) инсулиновый рецептор (*InsR*) — CTGGAGAAGCTGCTCGGTCATT (F) и GGCCATAGACACGGAAAAGAAG (R); полно-размерный лептиновый рецептор (*ObRb*) — GCATGCAGAATCAGTGATATTTGG (F) и CAAGCTGTATCGACACTGATTTCTTC (R); протеинфосфотириозинфосфатаза 1В (*PTP1B*) — CAACCGAGGAGGAACAAGG (F) и CAGTCTGTCAAGTGAACAATACCCG (R); М4-меланокортиновый рецептор (МК4Р) (*Mc4R*) — TGGGTGTCATAAGCCTGTTGG (F) и GCGTCCGTGTCCGTAAGT (R); дофаминовый рецептор (ДР) 1 типа (*DR1*) — ACATCTGGGTAGCCTTTGACATC (F) и TACCTGTCCACGCTGATCACG (R); ДР 2 типа (*DR2*) — GCAGCAGTCCGAGCTTTCAGA (F) и CGCCTGTTCACTGGGAAACT (R); проопиомеланокортин (ПОМК) (*POMC*) — AGGACCTCACCGGAAAG (F) и GTCAAGGGCTGTTTCACTCC (R); агути-подобный пептид (*Agrp*) — TGAAGAAGACAGCAGCAGACC (F) и TGAAGAAGCGGCAGTAGCAC (R); нейропептид Y (*Npy*) — ACCAGGCAGAGATATGGCAAGA (F)

и GGACATTTTCTGTGCTTTCTCTCATTA (R). В качестве референсного использовали ген *18S rRNA*. Полученные данные рассчитывали с помощью метода delta-delta  $C_T$ , как описано ранее (Derkach et al. 2019), с помощью программного обеспечения 7500 Software v2.0.6 и Expression Suite Software v1.0.3; значения RQ рассчитывали по отношению к контрольной группе.

#### Статистический анализ экспериментальных данных

Для статистической обработки данных использовали программу Microsoft Office Excel 2007, полученные результаты представляли как  $M \pm SEM$ . Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро — Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали t-критерий Стьюдента, статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

#### Результаты

Масса тела, масса эпидидимального и абдоминального жира, а также уровни постпрандиальной глюкозы и гликированного гемоглобина (HbA1c) у крыс с СД2 были значимо повышены в сравнении с группой К (табл. 1). У диабетических животных была нарушена толерантность к глюкозе, о чем свидетельствуют повышенные значения  $AUC_{0-120}$  для глюкозных кривых в ОГТТ (рис. 1; табл. 1). ИИ и ИС существенно не влияли на массу тела и жировой ткани. В то же время ИИ частично восстанавливал чувствительность к глюкозе и снижал уровни глюкозы и HbA1c, причем для HbA1c различия между группами Д и Д + ИИ были значимыми (табл. 1). Лечение ИС усугубляло оцениваемые показатели, что было связано с усилением потребления пищи в группе Д + ИС, которое было существенно выше, чем в контроле (табл. 1).

У диабетических крыс базовый уровень инсулина был значимо повышен, и отмечалась тенденция к повышению уровня лептина, но различия с группой К в этом случае не были значимыми ( $p = 0,056$ ) (рис. 2). Через 120 мин после глюкозной нагрузки (ОГТТ) уровни инсулина и лептина в группе Д превосходили таковые в группе К, а также базовые уровни гормонов (рис. 2). ИИ снижал базовые и стимулированные глюкозой уровни инсулина и лептина, причем в случае стимулированных уровней различия с группой Д были значимыми (рис. 2). Комбинация ИИ и ИС была менее эффективной,

Табл. 1. Масса тела и жировой ткани, потребление пищи, уровни глюкозы, гликированного гемоглобина и  $AUC_{0-120}$  для глюкозных кривых в ОГТТ у самцов крыс с диет-индуцированным СД2 и влияние лечения ИИ и ИС

Показатель	К	Д	Д + ИИ	Д + ИС	Д + ИИ + ИС
Масса тела, г	375,3 ± 8,5	424,8 ± 10,1 <sup>a</sup>	414,8 ± 10,6 <sup>a</sup>	439,5 ± 14,8 <sup>a</sup>	432,3 ± 16,0 <sup>a</sup>
Масса АЖ, г	5,63 ± 0,15	9,67 ± 0,70 <sup>a</sup>	9,43 ± 0,54 <sup>a</sup>	10,55 ± 0,80 <sup>a</sup>	9,87 ± 0,75 <sup>a</sup>
Масса ЭЖ, г	2,59 ± 0,12	4,05 ± 0,20 <sup>a</sup>	3,82 ± 0,19 <sup>a</sup>	4,42 ± 0,32 <sup>a</sup>	4,07 ± 0,33 <sup>a</sup>
Прием пищи, ккал/крыса/день*	56,8 ± 2,9	62,2 ± 2,5	54,8 ± 2,9	68,8 ± 3,6 <sup>a,c</sup>	60,7 ± 3,8
Глюкоза, mM**	4,93 ± 0,20	6,23 ± 0,28 <sup>a</sup>	5,42 ± 0,28	6,35 ± 0,31 <sup>a</sup>	5,97 ± 0,42
HbA1c, %	4,23 ± 0,13	6,12 ± 0,32 <sup>a</sup>	5,18 ± 0,22 <sup>a,b</sup>	5,97 ± 0,29 <sup>a</sup>	5,88 ± 0,33 <sup>a</sup>
$AUC_{0-120}$ усл. ед.***	1128 ± 45	1645 ± 83 <sup>a</sup>	1398 ± 95 <sup>a</sup>	1571 ± 88 <sup>a</sup>	1482 ± 76 <sup>a</sup>

Примечание: \* — объем потребляемой пищи (в килокалориях) рассчитывали в течение первых 6 дней лечения (до ОГТТ); \*\* — уровень глюкозы измеряли через 2 ч после потребления пищи; \*\*\* — значение  $AUC_{0-120}$  рассчитывали по результатам ОГТТ, который проводили на 7-й день эксперимента, как описано в методике. Различия с группами К (<sup>a</sup>) или Д (<sup>b</sup>) и между группой Д + ИИ и группами Д + ИС и Д + ИИ + ИС (<sup>c</sup>) статистически значимы при  $p < 0,05$ . Данные представлены как  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$ . Масса АЖ — масса абдоминального жира; масса ЭЖ — масса эпидидимального жира.

Table 1. Body and adipose tissue weight, food intake, glucose levels, glycated hemoglobin and  $AUC_{0-120}$  for glucose curves in OGTT in male rats with diet-induced DM2 and the effect of treatment with II and IC

Indicator	C	D	D + II	D + IC	D + II + IC
Body weight, g	375.3 ± 8.5	424.8 ± 10.1 <sup>a</sup>	414.8 ± 10.6 <sup>a</sup>	439.5 ± 14.8 <sup>a</sup>	432.3 ± 16.0 <sup>a</sup>
AF weight, g	5.63 ± 0.15	9.67 ± 0.70 <sup>a</sup>	9.43 ± 0.54 <sup>a</sup>	10.55 ± 0.80 <sup>a</sup>	9.87 ± 0.75 <sup>a</sup>
EF weight, g	2.59 ± 0.12	4.05 ± 0.20 <sup>a</sup>	3.82 ± 0.19 <sup>a</sup>	4.42 ± 0.32 <sup>a</sup>	4.07 ± 0.33 <sup>a</sup>
Food intake, kcal/rat/day*	56.8 ± 2.9	62.2 ± 2.5	54.8 ± 2.9	68.8 ± 3.6 <sup>a,c</sup>	60.7 ± 3.8
Glucose, mM**	4.93 ± 0.20	6.23 ± 0.28 <sup>a</sup>	5.42 ± 0.28	6.35 ± 0.31 <sup>a</sup>	5.97 ± 0.42
HbA1c, %	4.23 ± 0.13	6.12 ± 0.32 <sup>a</sup>	5.18 ± 0.22 <sup>a,b</sup>	5.97 ± 0.29 <sup>a</sup>	5.88 ± 0.33 <sup>a</sup>
$AUC_{0-120}$ c.u.***	1128 ± 45	1645 ± 83 <sup>a</sup>	1398 ± 95 <sup>a</sup>	1571 ± 88 <sup>a</sup>	1482 ± 76 <sup>a</sup>

Note: \*—amount of food consumed (in kilocalories) was calculated during the first 6 days of treatment (before OGTT); \*\*—glucose level was measured 2 hours after eating; \*\*\*— $AUC_{0-120}$  values were calculated from the results of OGTT, which was performed on the 7<sup>th</sup> day of the experiment, as described in the methods. Differences compared to the C (<sup>a</sup>) or D (<sup>b</sup>) groups and between the D + II group and the D + IC and D + II + IC (<sup>c</sup>) groups are significant at  $p < 0.05$ . The data are presented as  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$ . AF weight—abdominal fat weight; EF weight—epididymal fat weight.

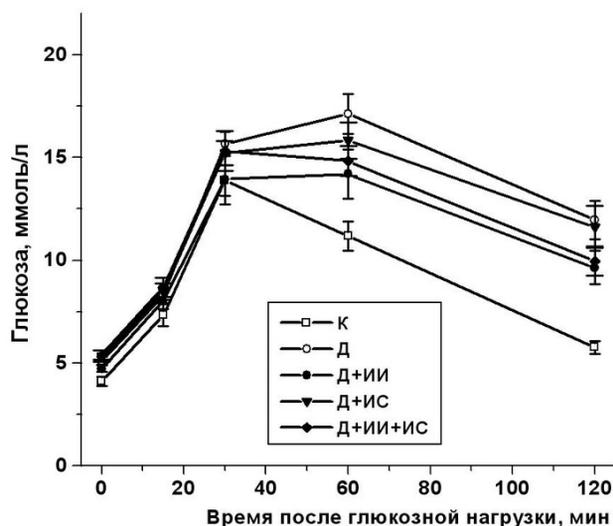


Рис. 1. Концентрационные глюкозные кривые, полученные в ОГТТ, у крыс с СД2 и влияние ИИ и ИС. Значения представлены как  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$

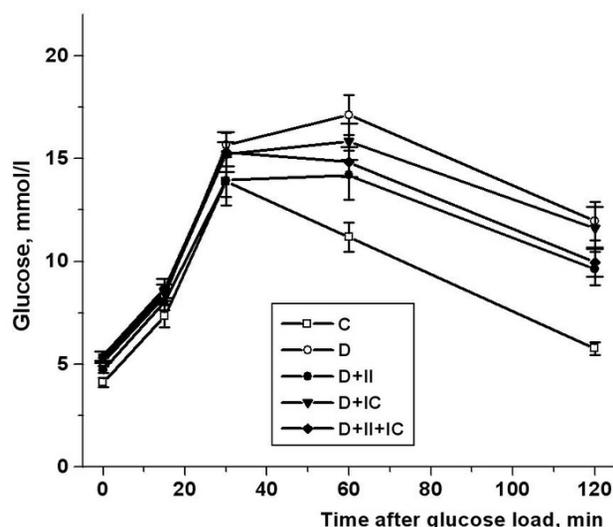


Fig. 1. Glucose concentration curves obtained in OGTT in rats with DM2 and the effect of II and IC. Data are presented as  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$

а ИС существенно не влиял на уровни инсулина и лептина (рис. 2). Базовые уровни ГПП-1 и грелина в группах К и Д не различались. Через 15 мин после глюкозной нагрузки отмечали повышение уровня ГПП-1 в контроле и ослабление этого ответа при СД2. Монотерапия ИИ частично восстанавливала ответ на глюкозу (рис. 2). Уровень грелина в контроле через 60 мин после нагрузки глюкозой снижался на 60%, при диабете — на 28%, и лечение ИИ и комбинацией ИИ и ИС восстанавливало ответ грелина на глюкозную нагрузку, на что указывает снижение уровня грелина в группах Д + ИИ и Д + ИИ + ИС, составившее 40% и 44% соответственно (рис. 2). ИС был в этом отношении неэффективен.

Уровень инсулина в гипоталамусе СД2-крыс был снижен в сравнении с группой К (табл. 2). В группах, которым вводили ИИ, отмечали повышение уровня инсулина, причем в группе Д + ИИ отличия от диабетической группы были значимыми. Уровень лептина в гипоталамусе крыс во всех диабетических группах был снижен, причем в группах, получавших ИИ, различия с контролем были значимыми (табл. 2).

Оценка концентрации гипофизарных гликопротеиновых гормонов в крови СД2-крыс показала, что уровень ЛГ не меняется, а уровень ТТГ имеет тенденцию к повышению, но различия с группой К не были значимыми ( $p = 0,052$ ) (табл. 3). Лечение ИИ и комбинацией ИИ и ИС поддерживало высокие уровни ЛГ и ТТГ в крови,

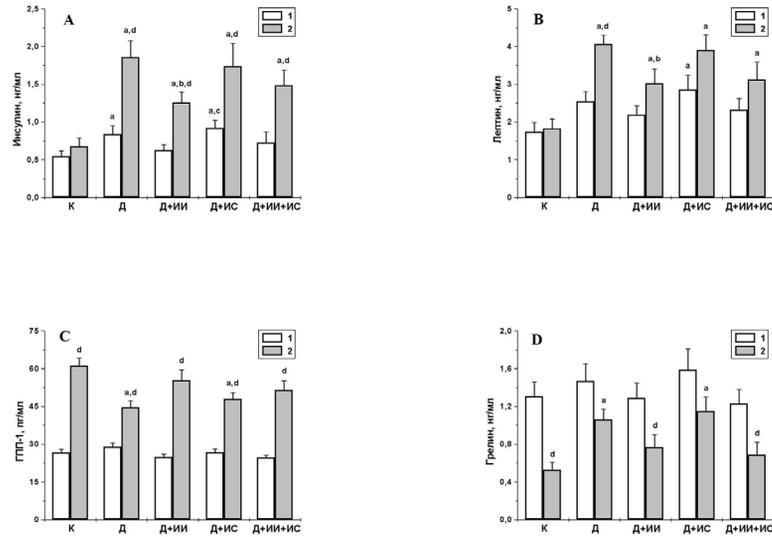


Рис. 2. Базовые и стимулированные глюкозой уровни инсулина (А), лептина (В), ГПП-1 (С) и грелина (D) в крови крыс с СД2 и влияние ИИ и ИС. 1 — базовые уровни гормональных агентов, 2 — стимулированные глюкозой уровни гормональных агентов. Стимулированные глюкозой уровни инсулина и лептина оценивали через 120 мин после глюкозной нагрузки, уровни ГПП-1 и грелина — через 15 и 60 мин соответственно. Различия с группами К (а) или Д (b) и между группой Д + ИИ и группами Д + ИС и Д + ИИ + ИС (с) статистически значимы при  $p < 0,05$ . Различия между базовым и стимулированным уровнями гормонального агента в одной группе (d) статистически значимы при  $p < 0,05$ .  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$

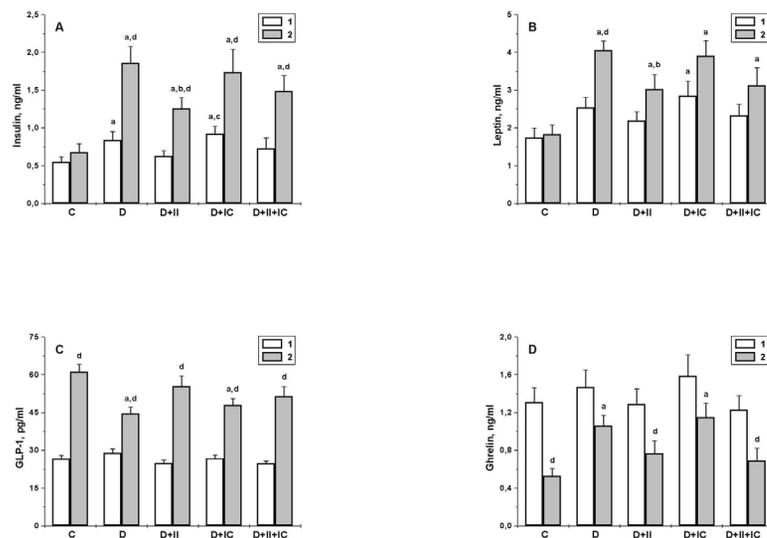


Fig. 2. Baseline and glucose-stimulated levels of insulin (A), leptin (B), GLP-1 (C) and ghrelin (D) in the blood of rats with DM2 and the effect of II and IC. 1—baseline levels of hormonal agents; 2—glucose-stimulated levels of hormonal agents. Glucose-stimulated insulin and leptin levels were assessed 120 min after the glucose load, GLP-1 and ghrelin levels were assessed 15 and 60 min, respectively. Differences compared to the C (a) or D (b) groups and between the D+II group and the D + IC and D + II + IC (c) groups are significant at  $p < 0.05$ . Differences between baseline and stimulated levels of a hormonal agent in the same group (d) are significant at  $p < 0.05$ .  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$

Табл. 2. Уровни инсулина и лептина в гипоталамусе крыс с СД2 и влияние лечения ИИ и ИС

Показатель	К	Д	Д + ИИ	Д + ИС	Д + ИИ + ИС
Инсулин, нг/г	1,45 ± 0,11	1,07 ± 0,10 <sup>а</sup>	1,72 ± 0,21 <sup>б</sup>	0,96 ± 0,14 <sup>а,с</sup>	1,46 ± 0,21
Лептин, нг/г	5,77 ± 0,73	3,84 ± 0,58	3,66 ± 0,43 <sup>а</sup>	4,11 ± 0,55	3,62 ± 0,42 <sup>а</sup>

Примечание: Различия с группами К (<sup>а</sup>) и Д (<sup>б</sup>) и между группой Д + ИИ и группами Д + ИС и Д + ИИ + ИС (<sup>с</sup>) статистически значимы при  $p < 0,05$ .  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$ .

Table 2. Levels of insulin and leptin in the hypothalamus of rats with DM2 and the effect of treatment with II and IC

Indicator	C	D	D + II	D + IC	D + II + IC
Insulin, ng/g	1.45 ± 0.11	1.07 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.72 ± 0.21 <sup>b</sup>	0.96 ± 0.14 <sup>a,c</sup>	1.46 ± 0.21
Leptin, ng/g	5.77 ± 0.73	3.84 ± 0.58	3.66 ± 0.43 <sup>a</sup>	4.11 ± 0.55	3.62 ± 0.42 <sup>a</sup>

Note: Differences compared to the C (<sup>a</sup>) or D (<sup>b</sup>) groups and between the D + II group and the D + IC and D + II + IC (<sup>c</sup>) groups are significant at  $p < 0.05$ .  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$ .

Табл. 3. Уровни ЛГ и ТТГ в крови крыс с СД2 и влияние лечения ИИ и ИС

Показатель	К	Д	Д + ИИ	Д + ИС	Д + ИИ + ИС
ЛГ, нг/мл	1,50 ± 0,18	1,61 ± 0,26	2,07 ± 0,21	1,54 ± 0,13	2,43 ± 0,37 <sup>а</sup>
ТТГ, мкМЕ/мл	0,79 ± 0,10	1,35 ± 0,23	1,75 ± 0,22 <sup>а</sup>	0,90 ± 0,16 <sup>б</sup>	1,42 ± 0,15 <sup>а</sup>

Примечание: Различия с группой К (<sup>а</sup>) и между группой Д + ИИ и группами Д + ИС и Д + ИИ + ИС (<sup>б</sup>) статистически значимы при  $p < 0,05$ .  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$ .

Table 3. Levels of LH and TSH in the blood of rats with DM2 and the effect of treatment with II and IC

Indicator	C	D	D + II	D + IC	D + II + IC
LH, ng/ml	1.50 ± 0.18	1.61 ± 0.26	2.07 ± 0.21	1.54 ± 0.13	2.43 ± 0.37 <sup>a</sup>
TSH, $\mu$ IU/ml	0.79 ± 0.10	1.35 ± 0.23	1.75 ± 0.22 <sup>a</sup>	0.90 ± 0.16 <sup>b</sup>	1.42 ± 0.15 <sup>a</sup>

Note: Differences compared to the C (<sup>a</sup>) and between the D + II group and the D + IC and D + II + IC (<sup>b</sup>) groups are significant at  $p < 0.05$ .  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$ .

которые, за исключением уровня ЛГ в группе Д + ИИ, значимо превосходили таковые в контроле (табл. 3). В случае ИС отмечали тенденцию к снижению продукции ТТГ, но различия с группой Д не были значимыми (табл. 3).

Уровни тиреоидных гормонов, включая эффекторный гормон тиреоидной оси — трийодтиронин (Т3), при СД2 были снижены и восстанавливались при лечении ИИ и комбинацией ИИ и ИС (табл. 4). Уровень тестостерона при СД2 имел тенденцию к снижению, но различия с контролем не были достоверными, как это иллюстрируют значения  $AUC_{10:00-14:00}$ , различия между которыми в группах К и Д не были статистически значимыми ( $p = 0,065$ )

(табл. 4). ИИ и комбинация ИИ и ИС существенно не влияли на уровни тестостерона. При этом в группе с лечением ИС отмечали усугубление дефицита fТЗ, а также более выраженный андрогенный дефицит, о чем свидетельствовало снижение значения  $AUC_{10:00-14:00}$  для тестостерона в группе Д + ИС в сравнении с контролем (табл. 4).

С помощью ПЦР в реальном времени в гипоталамусе крыс оценивали экспрессию генов, кодирующих рецепторные белки и факторы, регулирующие пищевое поведение. Экспрессия генов рецепторов инсулина (*InsR*) и лептина (*ObRb*), а также фосфатазы РТР1В (*Ptp1B*), негативного регулятора инсулинового и лептино-

Табл. 4. Уровни тиреоидных гормонов и суточная динамика уровня тестостерона у самцов крыс с СД2 и влияние на эти показатели лечения ИИ и ИС

Показатель	К	Д	Д + ИИ	Д + ИС	Д + ИИ + ИС
fT4, пМ	27,8 ± 1,3	23,2 ± 1,0 <sup>a</sup>	26,3 ± 0,7 <sup>b</sup>	22,2 ± 0,9 <sup>a, c</sup>	25,8 ± 0,9
tT4, нМ	92,2 ± 5,0	74,2 ± 5,0 <sup>a</sup>	98,2 ± 5,9 <sup>b</sup>	79,2 ± 4,7 <sup>c</sup>	91,3 ± 5,8 <sup>b</sup>
fT3, пМ	3,88 ± 0,12	3,40 ± 0,16 <sup>a</sup>	3,80 ± 0,14	3,01 ± 0,17 <sup>a, c</sup>	3,61 ± 0,16
tT3, нМ	2,64 ± 0,12	1,99 ± 0,14 <sup>a</sup>	2,69 ± 0,16 <sup>b</sup>	1,86 ± 0,13 <sup>a, c</sup>	2,36 ± 0,14
T, нМ (10,00)	13,42 ± 2,10	10,10 ± 1,70	10,68 ± 0,49	9,98 ± 1,57	11,32 ± 1,23
T, нМ (12,00)	17,97 ± 2,15	12,65 ± 1,65	16,33 ± 1,83	10,88 ± 1,05 <sup>a, c</sup>	13,88 ± 1,34
T, нМ (14,00)	15,33 ± 1,09	11,03 ± 1,60	12,72 ± 1,36	11,15 ± 1,43 <sup>a</sup>	14,22 ± 1,70
Тестостерон, AUC <sub>10:00–14:00</sub> <sup>*</sup>	64,7 ± 6,8	46,4 ± 5,6	56,1 ± 5,0	42,9 ± 3,7 <sup>a</sup>	53,3 ± 4,4

Примечание: \* — интегрированная площадь под кривой «концентрация тестостерона, нМ — время (10:00–14:00)». Различия с группами К (<sup>a</sup>) или Д (<sup>b</sup>) и между группой Д + ИИ и группами Д + ИС и Д + ИИ + ИС (<sup>c</sup>) статистически значимы при  $p < 0,05$ .  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$ .

Table 4. Levels of thyroid hormones and daily dynamics of testosterone levels in male rats with DM2 and the effect of II and IC treatment on these parameters

Indicator	C	D	D + II	D + IC	D + II + IC
fT4, pM	27.8 ± 1.3	23.2 ± 1.0 <sup>a</sup>	26.3 ± 0.7 <sup>b</sup>	22.2 ± 0.9 <sup>a, c</sup>	25.8 ± 0.9
tT4, nM	92.2 ± 5.0	74.2 ± 5.0 <sup>a</sup>	98.2 ± 5.9 <sup>b</sup>	79.2 ± 4.7 <sup>c</sup>	91.3 ± 5.8 <sup>b</sup>
fT3, pM	3.88 ± 0.12	3.40 ± 0.16 <sup>a</sup>	3.80 ± 0.14	3.01 ± 0.17 <sup>a, c</sup>	3.61 ± 0.16
tT3, nM	2.64 ± 0.12	1.99 ± 0.14 <sup>a</sup>	2.69 ± 0.16 <sup>b</sup>	1.86 ± 0.13 <sup>a, c</sup>	2.36 ± 0.14
T, nM (10.00)	13.42 ± 2.10	10.10 ± 1.70	10.68 ± 0.49	9.98 ± 1.57	11.32 ± 1.23
T, nM (12.00)	17.97 ± 2.15	12.65 ± 1.65	16.33 ± 1.83	10.88 ± 1.05 <sup>a, c</sup>	13.88 ± 1.34
T, nM (14.00)	15.33 ± 1.09	11.03 ± 1.60	12.72 ± 1.36	11.15 ± 1.43 <sup>a</sup>	14.22 ± 1.70
Testosterone, AUC <sub>10:00–14:00</sub> <sup>*</sup>	64.7 ± 6.8	46.4 ± 5.6	56.1 ± 5.0	42.9 ± 3.7 <sup>a</sup>	53.3 ± 4.4

Note: \*—integrated area under the curve “testosterone concentration, nM — time (10:00–14:00)”. Differences compared to the C (<sup>a</sup>) or D (<sup>b</sup>) groups and between the D + II group and the D + IC and D + II + IC (<sup>c</sup>) groups are significant at  $p < 0.05$ .  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$ .

вого сигналинга, при СД2 не менялась (табл. 5). Лечение ИИ и комбинаций ИИ и ИС снижало экспрессию гена *InsR* и повышало экспрессию гена *Ptp1B*, слабо влияя на экспрессию гена *ObRb* (табл. 5). ИС, напротив, повышал экспрессию генов *InsR* и *ObRb*, причем для инсулинового рецептора различия были значимыми по отношению к группе К, для лептинового рецептора — по отношению к группе Д (табл. 5). Экспрессия гена *Msc4R* снижалась в группе Д и восстанавливалась при обоих вариантах лечения с ИИ (табл. 5). Экспрессия гена *DIR*, кодирующего ДР 1-го типа, во всех группах не менялась, в то время как экспрессия гена *D2R*,

кодирующего ДР 2-го типа, снижалась в группе Д и восстанавливалась в группе Д + ИИ (табл. 5). При этом восстанавливалось и соотношение экспрессии генов *DIR* и *D2R*, которое в группе Д составило 1,65, а в группе Д + ИИ — 1,09. При СД2 отмечали повышение экспрессии генов, кодирующих факторы пищевого поведения — ПОМК (*POMC*), прекурсор анорексигенных меланокортиновых пептидов, и орексигенные факторы — нейропептид Y и агути-подобный пептид (*Npy*, *Agrp*), причем в наибольшей степени повышалась экспрессия гена *Npy* (табл. 5). Лечение ИИ и смесью ИИ и ИС повышало экспрессию гена *POMC* и подавляло экспрессию

Табл. 5. Экспрессия мРНК для компонентов сигнальных систем в гипоталамусе крыс с СД2 и влияние ИИ и ИС

Показатель	К	Д	Д + ИИ	Д + ИС	Д + ИИ + ИС
<i>InsR</i>	1,01 ± 0,06	1,25 ± 0,12	0,47 ± 0,06 <sup>a, b</sup>	1,64 ± 0,22 <sup>a, c</sup>	0,51 ± 0,08 <sup>a, b</sup>
<i>ObRb</i>	1,00 ± 0,11	0,89 ± 0,08	0,81 ± 0,08	1,38 ± 0,14 <sup>b, c</sup>	0,82 ± 0,10
<i>Ptp1B</i>	1,00 ± 0,05	0,91 ± 0,04	1,46 ± 0,15 <sup>a, b</sup>	0,97 ± 0,17	1,80 ± 0,18 <sup>a, b</sup>
<i>Mc4R</i>	1,02 ± 0,07	0,62 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,87 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,65 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,12
<i>D1R</i>	1,01 ± 0,14	1,14 ± 0,15	1,00 ± 0,11	1,09 ± 0,20	0,88 ± 0,12
<i>D2R</i>	1,02 ± 0,10	0,69 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,06	0,77 ± 0,12	0,78 ± 0,10
<i>POMC</i>	1,00 ± 0,04	1,37 ± 0,13 <sup>a</sup>	3,16 ± 0,42 <sup>a, b</sup>	1,10 ± 0,12 <sup>c</sup>	2,87 ± 0,44 <sup>a, b</sup>
<i>Agrp</i>	1,00 ± 0,05	1,36 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,07 ± 0,11	1,40 ± 0,22	1,10 ± 0,12
<i>Npy</i>	1,01 ± 0,04	2,49 ± 0,33 <sup>a</sup>	1,29 ± 0,18 <sup>b</sup>	2,38 ± 0,34 <sup>a, c</sup>	1,54 ± 0,15 <sup>a, b</sup>

Примечание: значения экспрессии представлены в относительных единицах (RQ) по отношению к контролю. Различия с группами К (<sup>a</sup>) или Д (<sup>b</sup>) и между группой Д + ИИ и группами Д + ИС и Д + ИИ + ИС (<sup>c</sup>) статистически значимы при  $p < 0,05$ . Данные представлены как  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$ .

Table 5. Expression of mRNA for components of signaling systems in the hypothalamus of rats with DM2 and the influence of II and IC

Indicator	C	D	D + II	D + IC	D + II + IC
<i>InsR</i>	1.01 ± 0.06	1.25 ± 0.12	0.47 ± 0.06 <sup>a, b</sup>	1.64 ± 0.22 <sup>a, c</sup>	0.51 ± 0.08 <sup>a, b</sup>
<i>ObRb</i>	1.00 ± 0.11	0.89 ± 0.08	0.81 ± 0.08	1.38 ± 0.14 <sup>b, c</sup>	0.82 ± 0.10
<i>Ptp1B</i>	1.00 ± 0.05	0.91 ± 0.04	1.46 ± 0.15 <sup>a, b</sup>	0.97 ± 0.17	1.80 ± 0.18 <sup>a, b</sup>
<i>Mc4R</i>	1.02 ± 0.07	0.62 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.87 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.65 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.92 ± 0.12
<i>D1R</i>	1.01 ± 0.14	1.14 ± 0.15	1.00 ± 0.11	1.09 ± 0.20	0.88 ± 0.12
<i>D2R</i>	1.02 ± 0.10	0.69 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.92 ± 0.06	0.77 ± 0.12	0.78 ± 0.10
<i>POMC</i>	1.00 ± 0.04	1.37 ± 0.13 <sup>a</sup>	3.16 ± 0.42 <sup>a, b</sup>	1.10 ± 0.12 <sup>c</sup>	2.87 ± 0.44 <sup>a, b</sup>
<i>Agrp</i>	1.00 ± 0.05	1.36 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.07 ± 0.11	1.40 ± 0.22	1.10 ± 0.12
<i>Npy</i>	1.01 ± 0.04	2.49 ± 0.33 <sup>a</sup>	1.29 ± 0.18 <sup>b</sup>	2.38 ± 0.34 <sup>a, c</sup>	1.54 ± 0.15 <sup>a, b</sup>

Note: Expression values are presented in relative units (RQ) relative to control. Differences compared to the C (<sup>a</sup>) or D (<sup>b</sup>) groups and between the D + II group and the D + IC and D + II + IC (<sup>c</sup>) groups are significant at  $p < 0.05$ .  $M \pm SEM$ ,  $n = 6$ .

гена *Npy*, в то время как монотерапия ИС не влияла на экспрессию этих генов и их соотношение (табл. 5).

### Обсуждение

Дефицит инсулина и лептина в мозге при различных формах диабета приводит не только к запуску нейродегенеративных процессов в ЦНС, но и к нарушению центральной (гипо-

таламической) регуляции метаболизма и эндокринной системы (Huang et al. 2018; Shpakov et al. 2015; Varela, Horvath 2012). Такой дефицит может наблюдаться не только при СД1 и при декомпенсированных формах СД2 с нарушенной инсулин-продуцирующей функцией панкреатических  $\beta$ -клеток, когда уровень инсулина в кровотоке снижен, но и на начальных стадиях СД2 и метаболического синдрома, когда в условиях повышенного уровня инсулина в крови

вследствие инсулиновой резистентности рецептор-опосредуемый транспорт инсулина в мозг нарушен. Тем самым, несмотря на системную гиперинсулинемию, уровень инсулина в мозге снижен, что продемонстрировано нами ранее у агути-мышей с генетически обусловленным меланокортиновым типом ожирения (Derkach et al. 2019; Romanova et al. 2018), а также у мышей и крыс с метаболическим синдромом, вызванным высококалорийной диетой (Romanova et al. 2018). Имеются данные о том, что у СД2-пациентов с гиперинсулинемией значительно снижен уровень инсулина в цереброспинальной жидкости, что также свидетельствует о нарушении транспорта инсулина через ГЭБ (Hu et al. 2013). Сходная ситуация наблюдается и для лептина, когда в условиях гиперлептинемии его содержание в мозге снижается (Derkach et al. 2019; Romanova et al. 2018).

В настоящем исследовании нами впервые было показано, что у крыс с моделью СД2, вызванной длительной высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина, несмотря на отчетливо выраженную гиперинсулинемию и гиперлептинемию, уровни инсулина и лептина в гипоталамусе снижены. Это ассоциировано с нарушенной толерантностью к глюкозе и повышением индекса инсулиновой резистентности (произведение базовых концентраций глюкозы и инсулина в крови), который в группе Д был на 93% выше, чем в контроле. Поскольку транспорт инсулина и лептина через ГЭБ осуществляется в основном через посредство их рецепторов, то развитие инсулиновой и лептиновой резистентности может рассматриваться как одна из ключевых причин снижения эффективности такого транспорта и развития дефицита инсулина и лептина в ЦНС. Необходимо отметить, что уровень генной экспрессии рецепторов инсулина и лептина в ЦНС, как мы полагаем, отрицательно коррелирует с эффективностью их транспорта. Так, показано, что при повышенном уровне экспрессии гена лептинового рецептора у агути-мышей с сильно выраженной гиперлептинемией транспорт лептина в глиальные клетки и микрососуды головного мозга существенно снижен (Pan et al. 2008). Следует отметить, что хотя для лептина в последние годы предлагаются альтернативные механизмы транспорта через ГЭБ, независимые от полноразмерных лептиновых рецепторов ObRb, подтверждений эти рецептор-независимые механизмы пока не получили (Sandin et al. 2021).

Использование ИИ как при монотерапии, так и совместно с ИС приводило к повышению уровня инсулина в ЦНС, компенсаторному снижению экспрессии гена инсулиновых рецепторов и повышению экспрессии негативного регулятора инсулинового сигналинга — фосфатазы РТР1В. Исследуя мышей, другие авторы также продемонстрировали повышение уровня инсулина в структурах мозга после его интраназального введения, но не выявили значимого снижения экспрессии рецепторов инсулина, что может быть обусловлено краткосрочным воздействием ИИ (Rhea et al. 2017; 2019). Повышение экспрессии и активности РТР1В в гипоталамусе приводит к дефосфорилированию и инактивации рецептора инсулина, стимулированного ИИ, что подавляет передачу инсулинового сигнала. РТР1В и родственная ей Т-клеточная фосфатаза являются основными негативными регуляторами инсулинового и лептинового сигналинга в гипоталамусе (Zhang et al. 2015). Важно отметить, что в наших экспериментах ИИ слабо влиял на уровни лептина и экспрессию лептиновых рецепторов в гипоталамусе.

Монотерапия ИИ лишь в небольшой степени влияла на глюкозный гомеостаз и базовые уровни инсулина, лептина, ГПП-1 и грелина, но при этом восстанавливала их ответы на глюкозную нагрузку в ОГТТ и улучшала тиреоидный статус, значимо повышая сниженные при СД2 уровни fT4, tT4 и tT3. Эти эффекты могут быть обусловлены нормализацией гипоталамической сигнализации, что выражается в восстановлении соотношения экспрессии DR 2 и 1 типов и экспрессии МК4R, сниженных при СД2, а также в изменении соотношения орексигенного нейропептида Y и ПОМК, прекурсора анорексигенных меланокортиновых пептидов, агонистов МК4R в пользу последних. Известно, что повышение активности МК4R-опосредуемых путей в гипоталамусе и снижение продукции нейропептида Y повышают активность тиролиберин-экспрессирующих нейронов и, как следствие, активируют тиреоидную ось, повышая синтез тиреоидных гормонов тироцитами щитовидной железы (Fekete et al. 2006; McCarty 1995). Нельзя исключить, что определенный вклад в стимуляцию секреции тиролиберина вносит инсулин-индуцированная активация лептиновой системы в гипоталамусе и стимуляция общих для инсулина и лептина компонентов 3-фосфоинозитидного пути, участвующих в позитивной регуляции тиреоидной оси (Ghamari-Langroudi et al. 2010). Развитие лептиновой и инсулиновой

резистентности и обусловленное этим нарушение транспорта лептина и инсулина из кровотока к гипоталамическим нейронам, наряду с гипергликемией и дислипидемией, являются одними из основных факторов дисфункций щитовидной железы при СД2 (Biondi et al. 2019). Нами показано, что даже непродолжительное лечение ИИ диабетических крыс, которое улучшает инсулиновую и лептиновую сигнализацию в гипоталамусе, приводит к восстановлению тиреоидной оси, повышая как уровень ТТГ, так и уровни тиреоидных гормонов. Ранее на моделях СД1 нами было продемонстрировано отчетливо выраженное стимулирующее влияние ИИ на продукцию ТТГ и тиреоидных гормонов, и обнаружена гиперпродукция ТТГ при длительном введении ИИ здоровым крысам (Derkach et al. 2015). Нами показано, что ИИ сравнительно слабо влиял на уровень ЛГ и андрогенный статус у СД2-крыс, хотя известно, что снижение экспрессии нейропептида Y и усиление активности меланокортиновой системы (повышение экспрессии генов МК4Р и ПОМК) должно было бы приводить к отчетливо выраженной стимуляции гонадной оси (Hill et al. 2008; Navarro, Kaiser 2013; Shprakov 2021). Возможно, это обусловлено необратимыми изменениями в семенниках при длительном СД2, которые не позволяют эффективно восстановить тестикулярный стероидогенез через центральные механизмы.

Монотерапия ИС практически не влияла на исследуемые метаболические и гормональные показатели, и даже в небольшой степени усиливала гиперфагию. Не было выявлено потенцирования восстанавливающего эффекта ИИ при совместном применении с ИС. Это отличает СД2 с ожирением и гиперинсулинемией от инсулинодефицитных моделей диабетической патологии — СД1 и неонатальной стрептозотоциновой модели СД2, изученных нами ранее (Derkach et al. 2018a; 2018b; 2019a; 2019b). Более того, по ряду показателей восстанавливающие эффекты ИИ в комбинации с ИС даже ослаблялись. Причина этого может быть связана с избытком С-пептида в мозге при изучаемой форме СД2. Поскольку в панкреатических  $\beta$ -клетках С-пептид и инсулин образуются в эквимолярных соотношениях и, в дополнение к этому, время полужизни С-пептида в кровотоке существенно выше, чем у инсулина, то при СД2 с гиперинсулинемией развивается также гипер-С-пептидемия (Alves et al. 2019). Имеются все основания полагать, что повышение уровня С-пептида в крови ассоциировано

с повышением содержания С-пептида в мозге, тем более что рецепторный механизм в транспорте С-пептида через ГЭБ, который мог бы меняться в условиях гипер-С-пептидемии, не показан. Имеются данные о том, что повышенные уровни С-пептида при СД2 и ожирении могут негативно влиять на функционирование микрососудов головного мозга и быть причиной ряда функциональных расстройств нервной и сердечно-сосудистой систем (Alves et al. 2019; Chen et al. 2021; Wang et al. 2021). В основе этого лежит доказанное тромболитическое действие С-пептида при его высоких концентрациях, а также стимулирующее влияние С-пептида на рост гладкомышечных клеток сосудов, приводящее к атеросклеротическим изменениям (Alves et al. 2019). Тем самым выдвинутая нами гипотеза о возможности усиления инсулинового сигналинга в мозге при СД2 с ожирением и периферической гиперинсулинемией при комбинированном использовании ИИ и ИС не получила подтверждения. Напротив, наши данные свидетельствуют о нецелесообразности использования С-пептида как отдельно, так и совместно с инсулином в условиях системной гиперинсулинемии, характерной для раннего СД2, метаболического синдрома и ожирения.

Таким образом, у крыс с диет-индуцированным СД2 монотерапия ИИ нормализовала сниженный при диабете уровень инсулина в гипоталамусе, улучшала глюкозный гомеостаз, тиреоидный статус, ответы инсулина, лептина и инкретинов на глюкозную нагрузку. В гипоталамусе ИИ восстанавливал экспрессию генов ПОМК и МК4Р, опосредующих снижение аппетита, и снижал экспрессию гена орексигенного нейропептида Y. В отличие от инсулинодефицитных форм СД1 и СД2, изученных нами ранее (Derkach et al., 2018a; 2018b; 2019a; 2019b), при СД2 с гиперинсулинемией и ожирением совместное применение ИИ и ИС не усиливало восстанавливающий эффект ИИ, в то время как монотерапия с ИС была неэффективной и даже усугубляла негативное влияние СД2 на пищевое поведение. Эти результаты показывают, что при СД2 применение ИС нецелесообразно, в том числе в комбинации с ИИ. Мы полагаем, что это обусловлено системным повышением уровня С-пептида при СД2 с гиперинсулинемией и его беспрепятственным поступлением к гипоталамическим структурам. Тем самым при СД2 с гиперинсулинемией необходимость доставки дополнительных количеств С-пептида в мозг отпадает. При этом применение ИИ оправдано,

поскольку уровень инсулина в ЦНС, в том числе в гипоталамусе, значимо снижен вследствие ослабления его рецептор-опосредуемого транспорта через ГЭБ, вызванного инсулиновой резистентностью.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального или явного конфликта интересов.

### Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest, either existing or potential.

### Соответствие принципам этики

Исследования с участием животных соответствуют принципам международной этики.

### Ethics Approval

The authors state that all international ethical principles relevant to research that includes animal subjects have been duly followed.

### Вклад авторов

а. Кира Викторовна Деркач — проведение экспериментов, анализ экспериментальных данных, статистическая обработка результатов, подготовка графических материалов, подготовка и корректировка рукописи;

б. Андрей Андреевич Бахтыков — проведение экспериментов, анализ экспериментальных данных, статистическая обработка результатов, подготовка графических материалов;

в. Наталия Евгеньевна Басова — анализ экспериментальных данных, статистическая обработка результатов, подготовка графических материалов, подготовка рукописи;

г. Вера Михайловна Бондарева — проведение экспериментов;

д. Александр Олегович Шпаков — подготовка и корректировка рукописи.

### Author Contributions

а. Kira V. Derkach—conducted experiments, analysed experimental data, carried out statistical

data processing, prepared supporting materials, prepared and proofread the manuscript;

б. Andrey A. Bakhtuykov—conducted experiments, analysed experimental data, carried out statistical data processing, prepared supporting materials;

в. Nataliia E. Basova—analysed experimental data, carried out statistical data processing, prepared supporting materials, prepared the manuscript;

г. Vera M. Bondareva—conducted experiments;

д. Alexander O. Shpakov—prepared and proofread the manuscript.

### Список сокращений

СД2 — сахарный диабет 2 типа; ИИ — интраназальный вводимый инсулин; СД1 — сахарный диабет 1 типа; ИС — интраназально вводимый С-пептид; ГЭБ — гематоэнцефалический барьер; ОГТТ — оральная глюкозотолерантная проба; HbA1c — гликированный гемоглобин; ГПП-1 — глюкагоноподобный пептид-1; ЛГ — лютеинизирующий гормон; ТТГ — тиреотропный гормон; fT4 — свободный тироксин; tT4 — общий тироксин; fT3 — свободный трийодтиронин; tT3 — общий трийодтиронин; Д — группа диабет без лечения; Д + ИИ — группа диабет с лечением интраназальным вводимым инсулином; Д + ИС — группа диабет с лечением интраназальным вводимым С-пептидом; Д + ИИ + ИС — диабет с лечением комбинацией интраназально вводимых инсулина и С-пептида; К — группа контроль.

### List of abbreviations

DM2—type 2 diabetes mellitus; II—intranasal injected insulin; DM1—type 1 diabetes mellitus; IC—intranasally administered C-peptide; BBB—blood-brain barrier; OGTT—oral glucose tolerance test; HbA1c—glycated hemoglobin; GLP-1—glucagon-like peptide-1; LH—luteinizing hormone; TSH—thyroid-stimulating hormone; fT4—free thyroxine; tT4—total thyroxine; fT3—free triiodothyronine; tT3—total triiodothyronine; D—diabetes without treatment; D + II—diabetes treated with intranasal insulin; D + IC—diabetes treated with intranasal C-peptide; D+II+IC—diabetes with combined treatment of intranasally administered insulin and C-peptide; C—control group.

### References

Al-Mrabeh, A. (2021)  $\beta$ -Cell dysfunction, hepatic lipid metabolism, and cardiovascular health in type 2 diabetes: New directions of research and novel therapeutic strategies. *Biomedicines*, vol. 9, no. 2, article 226. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020226> (In English)

- Alves, M. T., Ortiz, M. M. O., Dos Reis, G. V. O. P. et al. (2019) The dual effect of C-peptide on cellular activation and atherosclerosis: Protective or not? *Diabetes Metabolism Research and Reviews*, vol. 35, no. 1, article e3071. <https://doi.org/10.1002/dmrr.3071> (In English)
- Badenes, R., Qeva, E., Giordano, G. et al. (2021) Intranasal insulin administration to prevent delayed neurocognitive recovery and postoperative neurocognitive disorder: A narrative review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 18, no. 5, article 2681. <https://doi.org/10.3390/ijerph18052681> (In English)
- Biondi, B., Kahaly, G. J., Robertson, R. P. (2019) Thyroid dysfunction and diabetes mellitus: Two closely associated disorders. *Endocrine Reviews*, vol. 40, no. 3, pp. 789–824. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00163> (In English)
- Chen, Z., He, J., Ma, Q., Xiao, M. (2021) Association between c-peptide level and subclinical myocardial injury. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. vol. 12, article 680501. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.680501> (In English)
- Derkach, K. V., Bondareva, V. M., Shpakov, A. O. (2018) Coadministration of intranasally delivered insulin and proinsulin C-peptide to rats with the types 1 and 2 diabetes mellitus restores their metabolic parameters. *Advances in Gerontology*, vol. 8, no. 2, pp. 140–146. <https://doi.org/10.1134/S2079057018020030> (In English)
- Derkach, K. V., Bondareva, V. M., Shpakov, A. O. (2019a) Regulatory effects of intranasal C-peptide and insulin on thyroid and androgenic status of male rats with moderate type 1 diabetes mellitus. *Journal of Evolutional Biochemistry and Physiology*, vol. 55, no. 6, pp. 493–496. <https://doi.org/10.1134/S0022093019060073> (In English)
- Derkach, K. V., Bondareva, V. M., Perminova, A. A., Shpakov, A. O. (2019b) C-peptide and insulin during combined intranasal administration improve the metabolic parameters and activity of the adenylate cyclase system in the hypothalamus, myocardium, and epididymal fat of rats with type 2 diabetes. *Cell Tissue Biology*, vol. 13, no. 3, pp. 228–236. <https://doi.org/10.1134/S1990519X19030039> (In English)
- Derkach, K. V., Ivantsov, A. O., Chistyakova, O. V. et al. (2017) Intranasal insulin restores metabolic parameters and insulin sensitivity in rats with metabolic syndrome. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, vol. 163, no. 2, pp. 184–189. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3762-6> (In English)
- Derkach, K. V., Shpakova, E. A., Bondareva, V. M. et al. (2018b) The effect of intranasal administration of proinsulin C-peptide and its C-terminal fragment on metabolic parameters in rats with streptozotocin diabetes. *Journal of Evolutional Biochemistry and Physiology*, vol. 54, no. 3, pp. 242–245. <https://doi.org/10.1134/S0022093018030092> (In English)
- Derkach, K. V., Shpakova, E. A., Titov, A. M. et al. (2015) Intranasal and intramuscular administration of lysine-palmitoylated peptide 612–627 of thyroid-stimulating hormone receptor increases the level of thyroid hormones in rats. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, vol. 21, no. 3, pp. 249–260. <https://doi.org/10.1007/s10989-014-9452-6> (In English)
- Derkach, K., Zakharova, I., Zorina, I. et al. (2019) The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms to this effect. *PLoS One*, vol. 14, no. 3, article e0213779. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213779> (In English)
- Fekete, C., Singru, P. S., Sanchez, E. et al. (2006) Differential effects of central leptin, insulin, or glucose administration during fasting on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis and feeding-related neurons in the arcuate nucleus. *Endocrinology*, vol. 147, no. 1, pp. 520–529. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0956> (In English)
- Ghamari-Langroudi, M., Vella, K. R., Srisai, D. et al. (2010) Regulation of thyrotropin-releasing hormone-expressing neurons in paraventricular nucleus of the hypothalamus by signals of adiposity. *Molecular Endocrinology*, vol. 4, no. 12, pp. 2366–2381. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0203> (In English)
- Hill, J. W., Elmquist, J. K., Elias, C. F. (2008) Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, vol. 294, no. 5, pp. E827–E832. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00670.2007> (In English)
- Hu, S.-H., Jiang, T., Yang, S.-S., Yang, Y. (2013) Pioglitazone ameliorates intracerebral insulin resistance and tau-protein hyperphosphorylation in rats with type 2 diabetes. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, vol. 121, no. 4, pp. 220–224. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1333277> (In English)
- Huang, Y., He, Z., Gao, Y. et al. (2018) Phosphoinositide 3-Kinase is integral for the acute activity of leptin and insulin in male arcuate NPY/AgRP Neurons. *Journal of the Endocrine Society*, vol. 2, no. 6, pp. 518–532. <https://doi.org/10.1210/js.2018-00061> (In English)
- Kashyap, B., Hanson, L. R., Frey II, W. H. (2020) Intranasal insulin: A treatment strategy for addiction. *Neurotherapeutics*, vol. 17, no. 1, pp. 105–115. <https://doi.org/10.1007/s13311-019-00822-4> (In English)
- Lee, S.-H., Park, S.-Y., Choi, C.-S. (2022) Insulin resistance: From mechanisms to therapeutic strategies. *Diabetes and Metabolism Journal*, vol. 46, no. 1, pp. 15–37. <https://doi.org/10.4093/dmj.2021.0280> (In English)
- Lu, J., Xu, Z. (2019) Efficacy of intranasal insulin in improving cognition in mild cognitive impairment and alzheimer disease: A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Therapy*, vol. 26, no. 6, pp. e756–e762. <https://doi.org/10.1097/MJT.0000000000000926> (In English)
- McCarty, M. F. (1995) Central insulin may up-regulate thyroid activity by suppressing neuropeptide Y release in the paraventricular nucleus. *Medicine Hypotheses*, vol. 45, no. 2, pp. 193–199. [https://doi.org/10.1016/0306-9877\(95\)90068-3](https://doi.org/10.1016/0306-9877(95)90068-3) (In English)

- Navarro, V. M., Kaiser, U. B. (2013) Metabolic influences on neuroendocrine regulation of reproduction. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, vol. 20, no. 4, pp. 335–341. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e32836318ce> (In English)
- Pan, W., Hsueh, H., He, Y. et al. (2008) Astrocyte leptin receptor (ObR) and leptin transport in adult-onset obese mice. *Endocrinology*, vol. 149, no. 6, pp. 2798–2806. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1673> (In English)
- Rhea, E. M., Humann, S. R., Nirkhe, S. et al. (2017) Intranasal insulin transport is preserved in aged samp8 mice and is altered by albumin and insulin receptor inhibition. *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 7, no. 1, pp. 241–252. <https://doi.org/10.3233/JAD-161095> (In English)
- Rhea, E. M., Nirkhe, S., Nguyen, S. et al. (2019) Molecular mechanisms of intranasal insulin in SAMP8 mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 71, no. 4, pp. 1361–1373. <https://doi.org/10.3233/JAD-190707> (In English)
- Romanova, I. V., Derkach, K. V., Mikhrina, A. L. et al. (2018) Leptin, dopamine and serotonin receptors in hypothalamic POMC-neurons of normal and obese rodents. *Neurochemical Research*, vol. 43, no. 4, pp. 821–837. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2485-z> (In English)
- Sandin, E. S., Folberth, J., Müller-Fielitz, H. et al. (2021) Is LRP2 involved in leptin transport over the blood-brain barrier and development of obesity? *International Journal of Molecular Science*, vol. 22, no. 9, article 4998. <https://doi.org/10.3390/ijms22094998> (In English)
- Scherer, T., Sakamoto, K., Buettner, C. (2021) Brain insulin signalling in metabolic homeostasis and disease. *Nature Reviews. Endocrinology*, vol. 17, no. 8, pp. 468–483. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00498-x> (In English)
- Siacqua, A., Succurro, E., Armentaro, G. et al. (2021) Pharmacological treatment of type 2 diabetes in elderly patients with heart failure: Randomized trials and beyond. *Heart Failure Reviews*. [Online]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10741-021-10182-x> (accessed 17.01.2022). (In English)
- Serbis, A., Giapros, V., Kotanidou, E. P. et al. (2021) Diagnosis, treatment and prevention of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *World Journal of Diabetes*, vol. 12, no. 4, pp. 344–365. <https://doi.org/10.4239/wjd.v12.i4.344> (In English)
- Shaughness, M., Acs, D., Brabazon, F. (2020) Role of insulin in neurotrauma and neurodegeneration: A review. *Frontiers in Neuroscience*, vol. 14, article 547175. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.547175> (In English)
- Shen, J., Greenberg, B. H. (2021) Diabetes management in patients with heart failure. *Diabetes Metabolism Journal*, vol. 45, no. 2, pp. 158–172. <https://doi.org/10.4093/dmj.2020.0296> (In English)
- Shpakov, A. O. (2017) Mechanisms of action and therapeutic potential of proinsulin C-peptide. *Journal of Evolutional Biochemistry and Physiology*, vol. 53, no. 3, pp. 180–190. <https://doi.org/10.1134/S0022093017030024> (In English)
- Shpakov, A. O. (2021) Improvement effect of metformin on female and male reproduction in endocrine pathologies and its mechanisms. *Pharmaceuticals*, vol. 14, no. 1, article 42. <https://doi.org/10.3390/ph14010042> (In English)
- Shpakov, A. O., Derkach, K. V., Berstein, L. M. (2015) Brain signaling systems in the Type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases. *Future Science OA*, vol. 1, no. 3, article FSO25. <https://doi.org/10.4155/fso.15.23> (In English)
- Shpakov, A. O., Derkach, K. V., Surkova, E. V. et al. (2019) Perspektivy primeneniya intranazal'no vvodimogo insulina dlya korrektsii metabolicheskikh i gormonal'nykh narushenij pri sakharnom diabete i metabolicheskom sindrome [Prospects for the use of intranasally administered insulin for the correction of metabolic and hormonal disorders in diabetes mellitus and metabolic syndrome]. *Problemy endokrinologii — Problems of Endocrinology*, vol. 65, no. 5, pp. 389–395. <https://doi.org/10.14341/probl9960> (In Russian)
- Sukhov, I. B., Derkach, K. V., Chistyakova, O. V. et al. (2016) Functional state of hypothalamic signaling systems in rats with type 2 diabetes mellitus treated with intranasal insulin. *Journal of Evolutional Biochemistry and Physiology*, vol. 52, no. 3, pp. 204–216. <https://doi.org/10.1134/S0022093016030030> (In English)
- Sukhov, I. B., Shipilov, V. N., Chistyakova, O. V. et al. (2013) Long-term intranasal insulin administration improves spatial memory in male rats with prolonged type 1 diabetes mellitus and in healthy rats. *Doklady Biological Science*, vol. 453, no. 5, pp. 349–352. <https://doi.org/10.1134/S001249661306015X> (In English)
- Varela, L., Horvath, T. L. (2012) Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Reports*, vol. 13, no. 12, pp. 1079–1086. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.174> (In English)
- Wang, Y., Sun, W., Miao, J. et al. (2021) Higher fasting C-peptide is associated with post-stroke depression: A multicenter prospective cohort study. *BMC Neurology*, vol. 21, no. 1, article 383. <https://doi.org/10.1186/s12883-021-02413-3> (In English)
- Washburn, R. L., Mueller, K., Kaur, G. et al. (2021) C-Peptide as a therapy for type 1 diabetes mellitus. *Biomedicines*, vol. 9, no. 3, article 270. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9030270> (In English)
- Wysham, C., Shubrook, J. (2020) Beta-cell failure in type 2 diabetes: Mechanisms, markers, and clinical implications. *Postgraduate Medicine*, vol. 132, no. 8, pp. 676–686. <https://doi.org/10.1080/00325481.2020.1771047> (In English)
- Zakharova, I. O., Bayunova, L. V., Zorina, I. I. et al. (2021) Insulin and  $\alpha$ -tocopherol enhance the protective effect of each other on brain cortical neurons under oxidative stress conditions and in rat two-vessel forebrain ischemia/

reperfusion injury. *International Journal of Molecular Science*, vol. 22, no. 21, article 11768. <https://doi.org/10.3390/ijms222111768> (In English)

Zhang, Z.-Y., Dodd, G. T., Tiganis, T. (2015) Protein tyrosine phosphatases in hypothalamic insulin and leptin signaling. *Trends in Pharmacological Science*, vol. 36, no. 10, pp. 661–674. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.07.003> (In English)