


Бициклол регулирует глюконеогенез в печени у крыс с диабетом 2 типа и неалкогольной жировой болезнью печени, подавляя воспаление

[Хунсюэ Ли](#) , [Цянь Сюй](#), [Чэнь Сюй](#), [Юйсинь Ху](#), [Синьян Ю](#), [Канци Чжао](#), [Минцин Ли](#), [Мэн Ли](#),  [Цзюньфан Сюй](#) и [Хунъюй Куанг](#) *

- Первая дочерняя больница Харбинского медицинского университета, Харбин, Китай

Глюконеогенез в печени играет важную роль в поддержании гомеостаза метаболизма глюкозы в организме. Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) является наиболее частой причиной хронических заболеваний печени, в сочетании с сахарным диабетом 2 типа (СД2) может вызывать серьезные нарушения метаболизма глюкозы. Исследования подтвердили, что хронические воспалительные поражения печени являются основой СД2 в сочетании с НАЖБП (СД2 – НАЖБП), подавление воспаления печени может улучшить нарушения метаболизма глюкозы. Важно изучить безопасные и эффективные препараты для подавления воспаления печени, чтобы улучшить нарушения метаболизма глюкозы в организме. Бициклол - это производное бифенила, обладающее антиоксидантными и противовоспалительными свойствами. В настоящем исследовании были изучены гепатопротекторные эффекты и механизмы, лежащие в основе бициклола при СД2-НАЖБП. и были разработаны модели СД2-НАЖБП с / без лечения бициклолом. Результаты показали, что бициклол снижает уровень глюкозы в крови натощак, уровни сывороточных трансаминаз, резистентность к инсулину, адипогенез в печени, накопление липидов и заметно снижает гистологические изменения печени у крыс с СД2-НАЖБП. Мало того, бициклол заметно ослабляет индуцированную T2DM – NAFLD продукцию факторов воспаления (IL-1 β и TNF- α). Более того, бициклол подавлял экспрессию сигнального пути инсулина / глюконеогенеза (Akt, PGC-1 α и PEPCK). Эти данные свидетельствуют о том, что бициклол может быть потенциально эффективным препаратом для лечения СД2-НАЖБП и других метаболических нарушений. печеночный адипогенез, накопление липидов и значительное снижение гистологических изменений печени крыс при СД2-НАЖБП. Мало того, бициклол заметно ослабляет индуцированную T2DM – NAFLD продукцию факторов воспаления (IL-1 β и TNF- α). Более того, бициклол подавлял экспрессию сигнального пути инсулина / глюконеогенеза (Akt, PGC-1 α и PEPCK). Эти данные свидетельствуют о том, что бициклол может быть потенциально эффективным препаратом для лечения СД2-НАЖБП и других метаболических нарушений. печеночный адипогенез, накопление липидов и значительное снижение гистологических изменений печени крыс при СД2-НАЖБП. Мало того, бициклол заметно ослабляет индуцированную T2DM – NAFLD продукцию факторов воспаления (IL-1 β и TNF- α). Более того, бициклол подавлял экспрессию сигнального пути инсулина / глюконеогенеза (Akt, PGC-1 α и PEPCK). Эти данные свидетельствуют о том, что бициклол может быть потенциально эффективным препаратом для лечения СД2-НАЖБП и других метаболических нарушений.

Вступление

Гомеостаз глюкозы является основой поддержания биологических функций организма, которые в основном зависят от взаимодействия секреторной способности поджелудочной железы,

выработки эндогенной глюкозы и утилизации периферических тканей ([Kang et al., 2014](#)). Для выполнения своей функции главную роль играет эндогенный выход глюкозы, который в основном происходит в печени. В условиях голодания печень принимает более 90% эндогенного выхода глюкозы через печеночный глюконеогенез, что имеет большое значение для поддержания гомеостаза глюкозы ([Landau et al., 1996](#)). Следовательно, печень играет центральную роль в контроле выработки глюкозы.

НАЖБП в настоящее время признана наиболее распространенным хроническим заболеванием печени во всем мире с глобальной распространенностью 25,2%, которое стало основной причиной заболеваемости и смертности от заболеваний, связанных с печенью ([Younossi et al., 2019](#)). Как все мы знаем, НАЖБП сильно коррелирует с СД2, глобальная распространенность СД2 составляет 22,5% среди пациентов с НАЖБП. С другой стороны, примерно 45% пациентов с [НАЖБП](#) страдают диабетом ([Younossi et al., 2016](#)). Первоначальное накопление жира с последующим воспалением играет центральную роль в развитии поражения печени НАЖБП ([Than and Newsome, 2015](#)). Когда НАЖБП сочетается с СД2, повреждение печени ускоряется и риск смерти значительно увеличивается. При этом нарушается гомеостаз глюкозы в организме, что приводит к дальнейшему усугублению нарушений метаболизма глюкозы. Хорошо известно, что инсулинорезистентность, ожирение, хроническое воспаление являются частыми патогенными факторами СД2-НАЖБП. ИР, вызванное воспалением, считается типичным признаком СД2 и основой НАЖБП. Многочисленные исследования показали, что подавление воспаления может значительно улучшить повреждение печени при СД2 с [НАЖБП](#) ([Giribabu et al., 2018](#) ; [Leite et al., 2019](#)). В то же время было обнаружено, что различные препараты могут улучшить воспалительные поражения печени и принести пользу при нарушениях метаболизма глюкозы, вызванных СД2-НАЖБП ([Park et al., 2013](#) ; [Де Соуза и др., 2015](#)). Важно изучить безопасные и эффективные лекарства для лечения хронического воспаления печени и улучшения нарушений метаболизма глюкозы в организме.

Бициклол (4,4'-диметокси-5,6,5', 6'-диметилендиокси-2-гидрокси-метил-2'-карбонил бифенил) является одобренным лекарством в Китае, которое широко используется для лечения гепатита и печени. фиброз и повреждение печени ([Li and Gt, 2004](#)). Более того, все больше данных указывает на то, что бициклол обладает множественными биологическими эффектами, которые могут быть полезны при лечении или профилактике СД2-НАЖБП ([Han et al., 2014](#)). Глюконеогенез в печени является ключевым метаболическим механизмом гипергликемии в организме, а повышенное производство глюкозы в печени является основной причиной нарушений метаболизма глюкозы при СД2-НАЖБП. В нашем исследовании была предпринята попытка проанализировать влияние бициклола на глюконеогенез в печени у крыс с СД2-НАЖБП с точки зрения подавления воспаления печени, чтобы обеспечить безопасные и эффективные терапевтические цели для СД2-НАЖБП и других метаболических заболеваний.

Материалы и методы

Наркотики и химикаты

Бициклол был приобретен на фармацевтическом заводе Beijing Union (Пекин, Китай). Стрептозотозин (STZ) был приобретен у Sigma (Сент-Луис, Миссури, США). Наборы для иммуноферментного анализа крысиного интерлейкина-1 (IL-1 β), фактора некроза опухоли- α (TNF- α) и фосфоенолпируваткарбоккиназы (PEPCK) были приобретены в Bosterbio (Ухань, Китай). Наборы общего холестерина (TC), триглицерида (TG), аланинаминотрансферазы (ALT) и глутамино-щавелевоуксусной трансаминазы (AST) были приобретены в Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute (Нанкин, Китай). Сериновая протеинкиназа (Akt) фосфорилирует сериновую протеинкиназу (*p*-Akt), рецептор γ coactivator-1 α , активируемый пролифератором пероксисом (PGC-1 α), антитела к IL-1 β и TNF- α были приобретены в Wanleibio (Шэньян, Китай). Антитело PEPCK

было приобретено в Proteintech Group (Чикаго, США). Набор ВСА был приобретен в Beyotime (Китай).

Модели на животных и лечение

Тридцать семь самцов крыс Sprague-Dawley (возраст 6 недель, 120–130 г) были приобретены в Хэйлунцзянском университете китайской медицины (Харбин, Китай). Крыс содержали в помещении с контролируемой температурой ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) с 12-часовым циклом свет / темнота и относительной влажностью 40–70%. Им давали свободный доступ к пище и воде, а массу тела крыс определяли еженедельно. Крысы были случайным образом разделены на следующие пять групп, как показано на [рисунке 1](#). Исследование было одобрено этическим комитетом Первой дочерней больницы Харбинского медицинского университета и соответствовало принципам Хельсинкской декларации. Все процедуры с животными проводились в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных Национального института здравоохранения (NIH Publications No. 8023, Revised 1978).

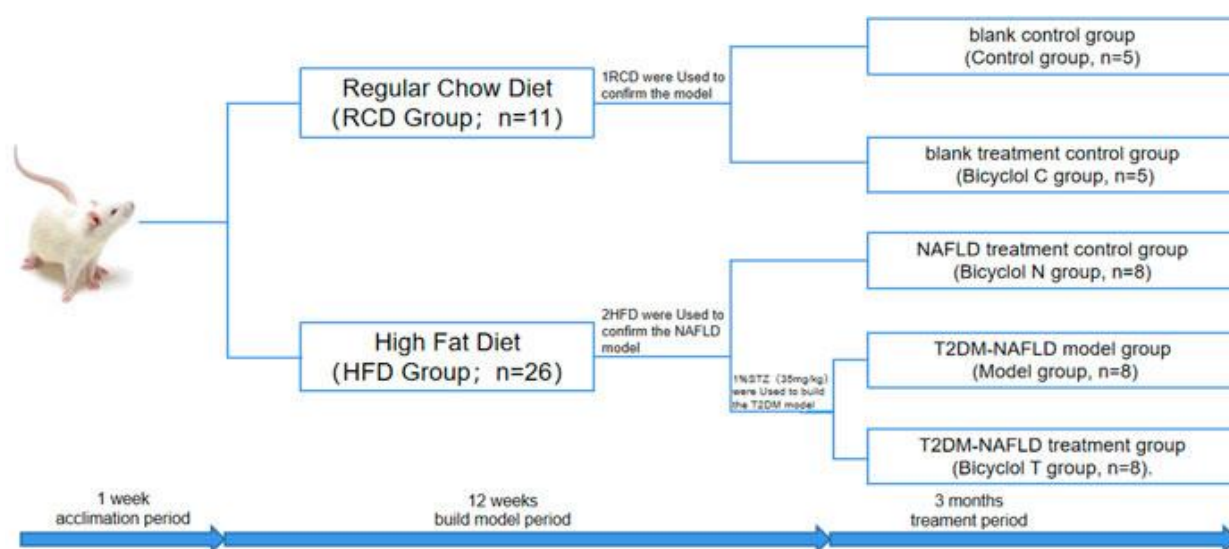


РИСУНОК 1. Принципиальная схема группировки экспериментов.

После периода акклиматизации в течение 1 недели крысы были случайным образом разделены на две группы: группу с обычным питанием (группа RCD, $n = 11$) и с рационом с высоким содержанием жиров (состав был следующим: 10% сала, 20% сахарозы, и 70% группа с обычной диетой) (группа HFD, $n = 26$). Через 10 недель одну крысу в группе RCD и двух крыс в группе HFD использовали для подтверждения модели. В то же время, группа RCD была случайным образом разделена на пустую контрольную группу (контрольная группа, $n = 5$) и пустая группа обработки (группа бициклола C, $n = 5$). Группы HFD были случайным образом разделены на группы лечения НАЖБП (Bicyclol N группа, $n = 8$), T2DM-НЖБП модель управления группой (группа, модель $n = 8$), а также в группе лечения СД2-НАЖБП (группа бициклола T, $n = 8$). Модельная группа и группа бициклола T получали внутрибрюшинную (ip) инъекцию 1% стрептозотоцина (STZ) в дозе 35 мг / кг через 72 часа после инъекции STZ, уровень глюкозы в крови натощак (FBG) измеряли с помощью глюкометра для измерения уровня глюкозы в крови. два дня непрерывно, и $\text{FBG} \geq 7,8$ ммоль / л использовался, чтобы указать на успешную модель диабета.

Через 12 недель после моделирования контрольной группе и модельной группе ежедневно давали 5 мл очищенной воды, а группам, обработанным бициклолом, давали бициклол в дозе 300 мг / кг / день (ig) в течение 3 месяцев. В конце эксперимента в каждой группе осталось по пять крыс, и все 25 животных были анестезированы 2% пентобарбиталом в дозе 60 мг / кг (внутрибрюшинно), кровь собирали через брюшную аорту и центрифугировали, получали сыворотку для биохимических

тестов. Печень быстро извлекали, взвешивали и делали срезы, и для каждого анализа проводили соответствующее хранение. Влажную массу печени измеряли для расчета индекса печени с использованием следующего уравнения: Индекс печени = влажная масса печени / масса тела × 100%.

Измерение биохимических параметров сыворотки

Уровни ВБР измеряли с помощью глюкометра (BAYER, Германия). Уровни инсулина в сыворотке определяли с помощью полуавтоматического анализатора AIA-1800 (Tosoh Corporation, Япония). Модель гомеостаза оценки инсулинорезистентности (HOMA-IR) рассчитывалась следующим образом: $HOMA-IR = (FBG \times FINS) / 22,5$. TC, TG, ALT и AST в сыворотке измеряли с помощью имеющегося в продаже набора в соответствии с инструкциями производителя.

Гистопатология и ультраструктурные изменения

Ткань печени, фиксированная 4% параформальдегидом, заливали парафином, делали срезы толщиной 4 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином. Гистологические оценки срезов печени наблюдали под оптическим микроскопом. В то же время другие ткани печени фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом, а затем ткани заливали, делали срезы и дважды окрашивали 3% уранилацетат-цитратом свинца, ультраструктурные изменения фиксировали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (JEOL, Токио, США). Япония).

Анализ Элизы

Уровни TNF- α , IL-1 β и PEPCK в сыворотке оценивали с помощью наборов для ELISA в соответствии с инструкциями производителя.

Иммуногистохимический анализ

Фиксированные 4% параформальдегидом и залитые парафином срезы печени помещали на предметные стекла, ткань печени депарафинизировали, обновляли лимонной кислотой (pH 6,0), инкубировали в 3% H_2O_2 в течение 25 минут и блокировали 10% нормальной козьей сывороткой. 30 минут. Затем слайды инкубировали соответственно с анти-*p*-Akt, анти-PGC-1 α , анти-TNF- α , анти-IL-1 β и анти-PEPCK в течение ночи при 4 ° C. Инкубация со вторичными антителами 50 мин. После стадии промывки PBS 3,3'-диаминобензидин использовали в течение 3 минут и окрашивали гематоксилином. Изображения были сделаны с исходным увеличением × 400 (Nikon, Япония).

Вестерн-блот

Общий белок печени крысы экстрагировали буфером для лизиса RIPA с 1% ингибитором протеазы и 10% ингибитором фосфатазы. Концентрацию белка измеряли с помощью набора BCA и регулировали с использованием буфера для лизиса RIPA. Затем белок разделяли с помощью SDS-PAGE и переносили на мембраны PVDF. После блокирования 5% обезжиренным молоком в течение 1 часа мембраны затем инкубировали с антителом в течение ночи при 4 ° C и инкубировали с вторичным антителом при комнатной температуре в течение 1 часа после трехкратной промывки PBST. Затем полосы белка детектировали с помощью прибора для получения изображений с помощью инфракрасного лазера Odyssey (LI-COR) и изображения анализировали с использованием программного обеспечения Odyssey Application Software 5.2.5.

Статистический анализ

Все данные были выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Сравнения между несколькими группами проводились с помощью одностороннего дисперсионного анализа, а статистический анализ выполнялся с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8. Статистически значимыми считались значения с $p < 0,05$.

Результаты

Влияние бициклола на массу тела, индекс печени, размер печени и гистопатологическое исследование у крыс

Через 3 месяца масса тела и печеночный индекс крыс в модельной группе и группе бициклола С значительно снизились по сравнению с нормальными крысами в контрольной группе ($p < 0,05$). Прирост массы тела в группе бициклола Т был ниже, чем в группе модели ($p < 0,05$) и группе бициклола N ($p < 0,05$) (рисунки 2А, В).

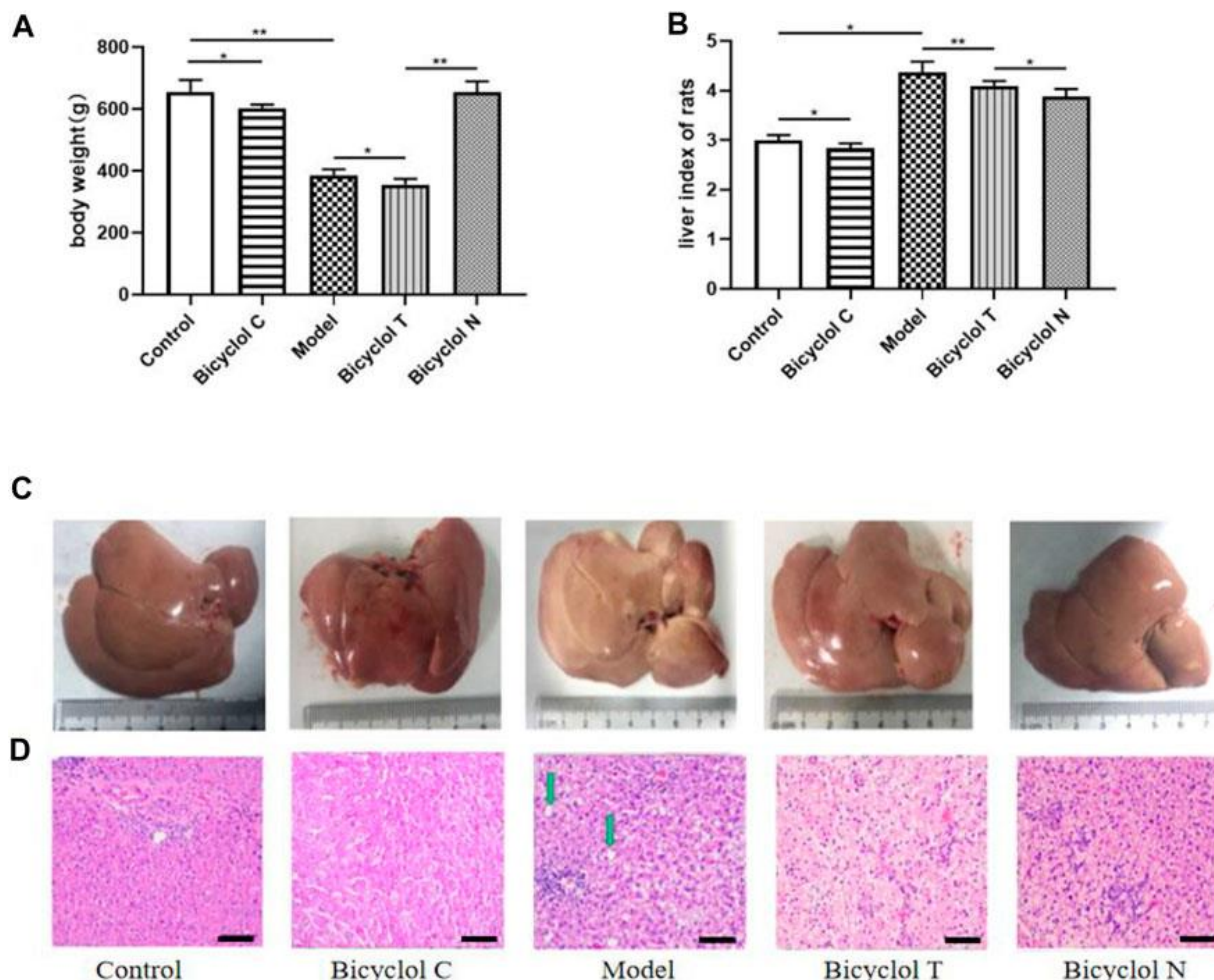


РИСУНОК 2. Влияние бициклола на массу тела, объем печени и гистопатологическое исследование у крыс с СД2-НАЖБП. (А) Масса тела. (В) Печеночный индекс крыс. (С) Внешний вид печени. (D) Окрашивание гематоксилином и эозином: липидные капли (зеленая стрелка) в печени. Данные представлены как средние значения \pm стандартное отклонение. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

При наблюдении невооруженным глазом печень контрольной группы была темно-красной, блестящей, влажной и упругой. В группе моделей печень была увеличена, потеряла блеск и жесткую текстуру. Травма печени значительно уменьшилась после лечения бициклолом. В соответствии с этими данными размер печени заметно уменьшился в группах, получавших бициклол (рис. 2С).

Окрашенные HE срезы показаны на рисунке 2D, в контрольной группе и группе бициклола С гистология печени показала, что паренхима печени полностью нормальна. Однако в модельной группе большинство гепатоцитов были набухшими и различались по размеру, края были нечеткими, структура долек печени была нечеткой и было много липидных капель. Лечение бициклолом предотвратило гистопатологические изменения и уменьшило поражение печени, в

группе бициклола N гистология печени показала нормальную структуру и некоторые липидные капли. В группе бициклола T дольки печени имели относительно нормальную структуру и несколько липидных капель. Согласно этим результатам, бициклол может снизить массу тела и индекс печени, улучшить печень и накопление жира, а затем.

Бициклол улучшает FBG, чувствительность к инсулину и липидный профиль сыворотки у крыс, получавших HFD

Уровень ВБР в Модельной группе был выше, чем в Контрольной ($p < 0,01$). По сравнению с модельной группой, уровень глюкозы в крови был явно снижен в группе бициклола T ($p < 0,05$); По сравнению с группой бициклола N, уровень FBG в группе бициклола T был явно повышен (рис. 3А). Дальнейшие исследования показали, что уровень инсулина и HOMA-IR в группе бициклола T был ниже, чем в группе модели ($p < 0,01$), и выше, чем в группе бициклола N ($p < 0,01$) (рисунки 3В, С).

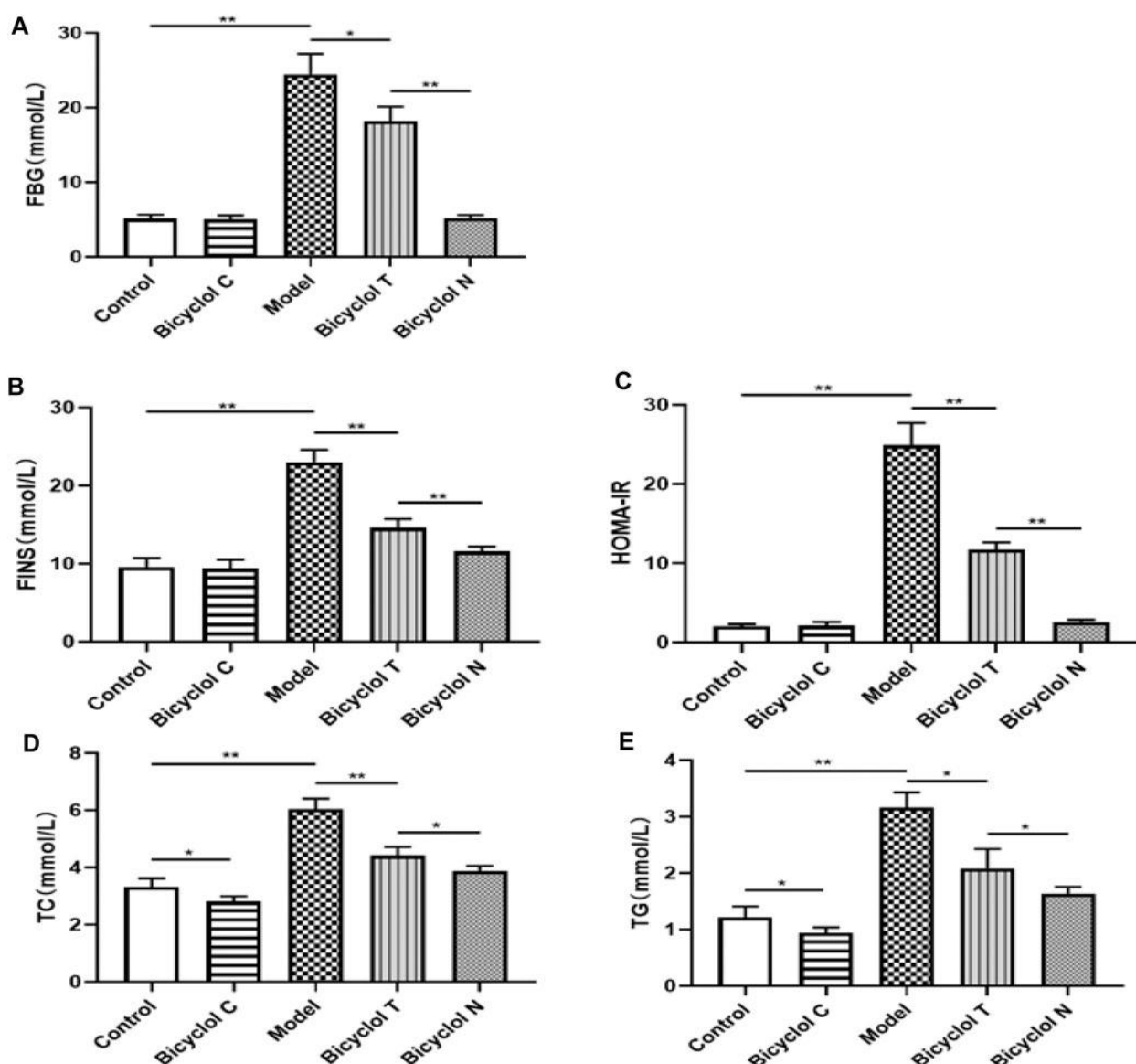


РИСУНОК 3. Влияние бициклола на уровни липидов и глюкозы в крови у крыс с T2DM – NAFLD (A) FBG. (B) ЛАПЫ. (C) HOMA-IR. (D) ТС. (E) ТГ. Данные представлены как средние значения ± стандартное отклонение. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

По сравнению с контрольной группой уровни ТС, TG были значительно выше в модельной группе ($p < 0,01$) и ниже в группе бициклола C ($p < 0,05$); в то время как уровни ТС, TG в группе бициклола T

были ниже, чем в группе модели ($p < 0,01$, $p < 0,05$), и повышены, чем в группе бициклола N ($p < 0,05$) (рисунки 3D, E). Результаты показали, что бициклол может снижать уровень глюкозы в крови и улучшение липидного обмена у крыс с СД2-НАЖБП.

Бициклол ослабляет маркеры повреждения печени у крыс, получавших HFD

Как показано на [фиг. 4](#), по сравнению с контрольной группой уровни сывороточных ALT и AST были значительно увеличены в модельной группе ($p < 0,01$) и были снижены в группе бициклола C ($p < 0,05$). По сравнению с группой Model, уровни ALT и AST заметно снизились в группе Bicyclol T ($p < 0,01$, $p < 0,05$). По сравнению с группой бициклола N уровни ALT и AST были увеличены в группе бициклола T ($p < 0,05$). Результаты показали, что бициклол может улучшить функцию печени у крыс с СД2-НАЖБП.

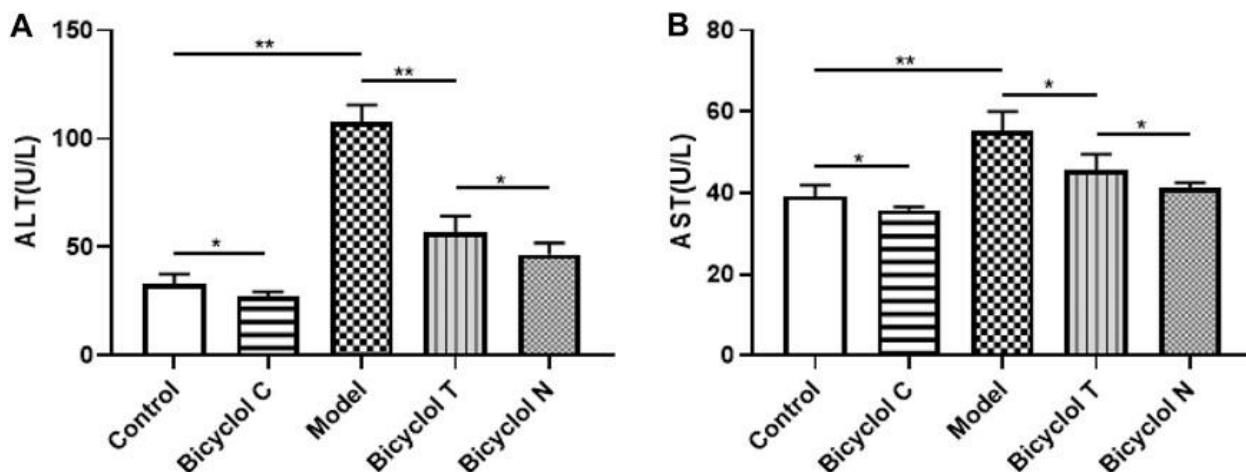


РИСУНОК 4. Влияние бициклола на уровни АЛТ и АСТ у крыс с СД2-НАЖБП (А) АЛТ. (В) АСТ. Данные представлены как средние значения \pm стандартное отклонение. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

Бициклол снимает воспаление печени и сыворотки у крыс, получавших HFD

Как показано на [фиг. 5A](#), расположение гепатоцитов в контрольной группе и группе бициклола С было плотным и аккуратным, а размер митохондрий был относительно однородным без вздутия. Однако в модельной группе ядро гепатоцита сократилось и разбилось на множество частей, митохондрии были устроены беспорядочно с множеством липидных капель и инфламмасом. В то время как липидные капли и инфламмасы значительно уменьшились после лечения бициклолом.

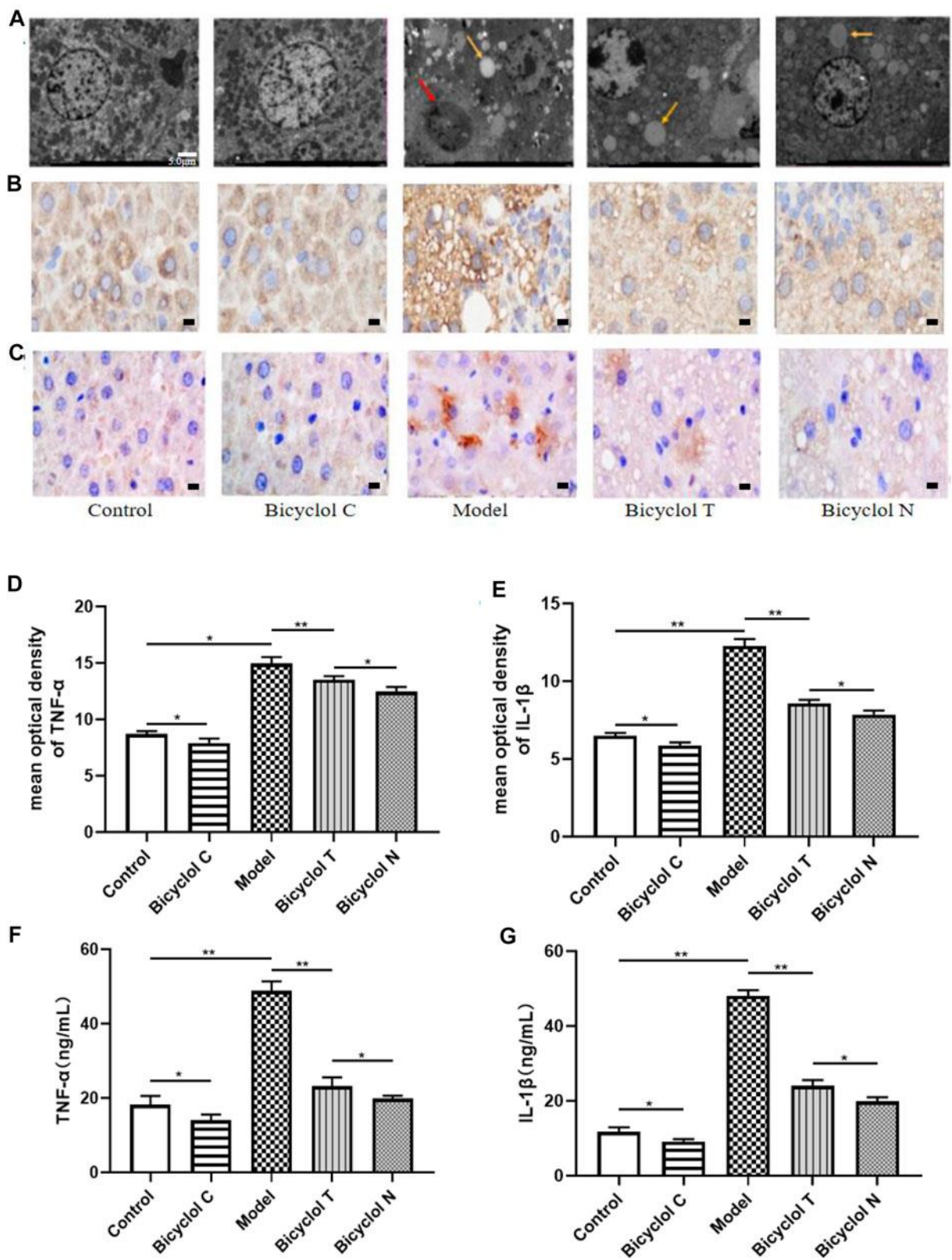


РИСУНОК 5. Влияние бициклола на воспаление печени и сыворотки крови при СД2 с НАЖБП крыс (А) ПЭМ-изображения (* 1,5 к) из ПЭМ, показывающие характерные инфламмосомы (красная стрелка) и липидные капли (желтая стрелка) в печени. (В) Экспрессия TNF-α, определенная ИНС. (С) Экспрессия IL-1β, определяемая ИНС. (D) Анализ средней оптической плотности экспрессии TNF-α в печени. (E) Анализ средней оптической плотности экспрессии IL-1β в печени. (F) Уровни TNF-α в сыворотке и (G) Уровни IL-1β в сыворотке. Данные представлены как средние значения ± стандартное отклонение. * p < 0,05. ** p < 0,01.

Наборы Elisa и иммуногистохимия (ИНС) были использованы для тестирования уровней традиционных воспалительных факторов (TNF- α , IL-1 β) в сыворотке и печени. По сравнению с контрольной группой уровни TNF- α , IL-1 β были значительно увеличены в модельной группе ($p < 0,01$) и снизились в группе бициклола С ($p < 0,05$). По сравнению с модельной группой уровни TNF- α , IL-1 β заметно снизились в группе бициклола Т ($p < 0,01$). По сравнению с группой бициклола N, уровни TNF- α , IL-1 β были увеличены в группе бициклола Т ($p < 0,05$) ([рисунки 5B-G](#)). Результаты показали, что бициклол может уменьшать воспаление сыворотки и печени у крыс T2DM – NAFLD.

Влияние бициклола на экспрессию Akt / PGC-1 α

Чтобы проверить, участвует ли путь Akt / PGC-1 α в механизме T2DM – NAFLD, мы исследовали их экспрессию с помощью иммуногистохимии и вестерн-блоттинга. Результаты показали, что экспрессия p -Akt была ниже в модельной группе ($p < 0,01$) и выше в группе бициклола С ($p < 0,05$), чем в контрольной группе. Уровень p -Akt был выше в группе Bicyclol Т ($p < 0,01$), чем в группе Model после лечения. По сравнению с группой бициклола N, экспрессия p -Akt была снижена в группе бициклола Т ($p < 0,01$). Иммуногистохимия и вестерн-блоттинг также показали, что уровень экспрессии PGC-1 α был выше в модельной группе ($p < 0,01$) и ниже в группе бициклола С ($p < 0,05$), чем в группе контроля. После лечения уровень PGC-1 α был ниже в группе бициклола Т ($p < 0,05$), чем в модельной группе. По сравнению с группой бициклола N, экспрессия PGC-1 α была увеличена в группе бициклола Т ($p < 0,05$) ([рис. 6](#)). Результаты показали, что бициклол может увеличивать фосфорилирование Akt, подавляя уровень белка PGC-1 α у крыс T2DM-NAFLD.

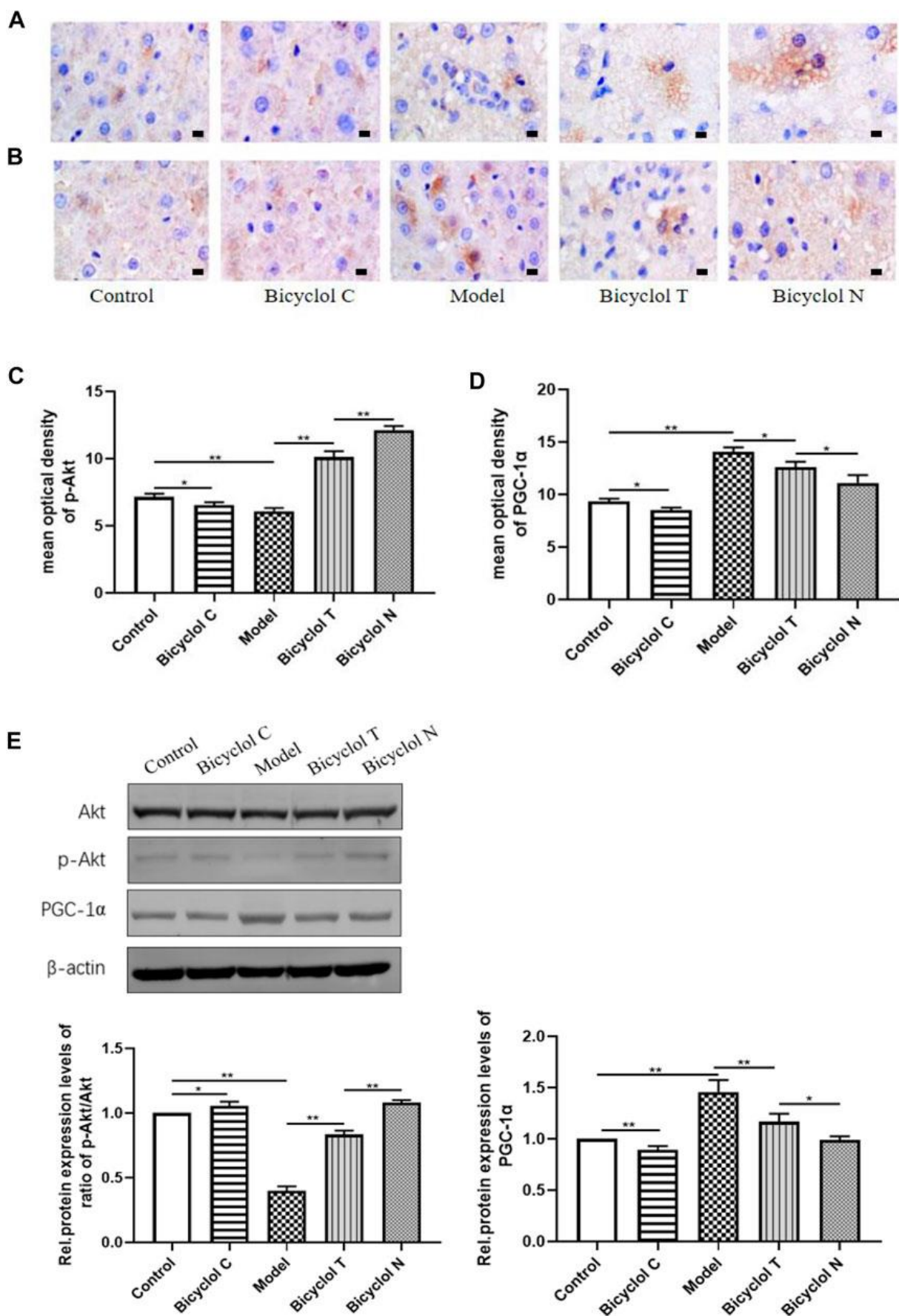


РИСУНОК 6 . Влияние бициклола на регуляцию экспрессии гена сигнального пути Akt / PGC-1α при СД2 с НАЖБП у крыс (А) Экспрессия p -Akt, определяемая с помощью ИГХ. (В) Экспрессия PGC-1α, определяемая ИHC. (С) Анализ средней оптической плотности экспрессии p -Akt в печени. (D) Анализ

средней оптической плотности экспрессии PGC-1 α в печени. (E) Вестерн-блоттинг Akt, p-Akt, PGC-1 α в печени. Данные представлены как средние значения \pm стандартное отклонение. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

Повышенный печеночный глюконеогенез в печени и сыворотке крыс, получавших HFD, и подавленный бициклолом

Наборы для ELISA, ИГХ и Вестерн-блот тестировали экспрессию белка, связанного с глюконеогенезом (PEPCK), в сыворотке и печени. По сравнению с контрольной группой, экспрессия PEPCK была значительно увеличена в модельной группе ($p < 0,01$) и уменьшилась в группе бициклола С ($p < 0,01$). В то время как по сравнению с модельной группой, экспрессия PEPCK заметно снизилась в бициклоле. Группа Т ($p < 0,01$). По сравнению с группой бициклола N, экспрессия PEPCK была увеличена в группе бициклола Т ($p < 0,05$) (рис. 7). Результаты показали, что бициклол может снижать печеночный глюконеогенез в сыворотке и печени у крыс T2DM – NAFLD.

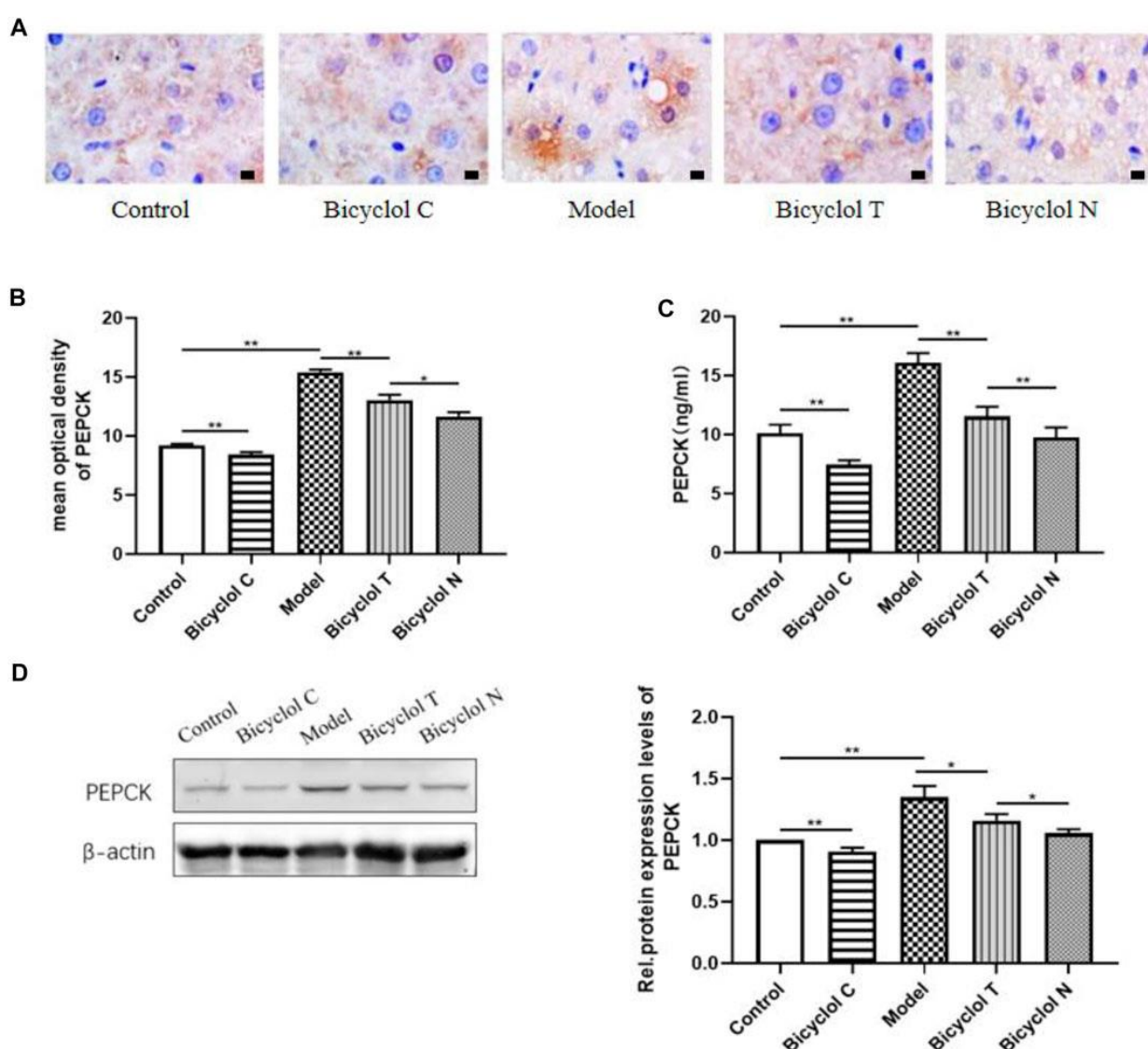


РИСУНОК 7 . Влияние бициклола на PEPCK при T2DM с НАЖБП крысиной сывороткой и печенью (A) экспрессия PEPCK, определенная с помощью ИHC. (B) Анализ средней оптической плотности экспрессии PEPCK в печени. (C) Уровень PEPCK в сыворотке. (D) Вестерн-блоттинг PEPCK в печени. Данные представлены как средние значения \pm стандартное отклонение. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$.

Обсуждение

Нарушение метаболизма глюкозы является основной причиной гипергликемии, которая часто сочетается с гиперинсулинемией, вызывая многие метаболические заболевания ([Giugliano et al., 2008](#)). Во всем мире СД2 в сочетании с НАЖБП является распространенным метаболическим заболеванием с чертой хронического гепатита. Это критическая проблема для здоровья, связанная с повреждением печени, нарушением уровня глюкозы в крови и влияющая на качество жизни людей ([Feneberg and Malfertheiner, 2012](#)). Кормление HFD широко используется для индукции стеатоза печени у экспериментальных крыс, и крысы SD, по-видимому, подвержены развитию стеатогепатита при кормлении HFD ([Takahashi et al., 2012](#)). Здесь мы использовали крыс SD для установления модели T2DM – NAFLD по HFD и STZ (ip). Сравнивая группу лечения СД2-НАЖБП, получавшую бициклол, и группу НАЖБП, получавшую бициклол, мы обнаружили, что нарушение метаболизма глюкозы может нанести огромный ущерб крысам. Глюконеогенез в печени может поддерживать уровень глюкозы и липидов в клетках или во всем организме в стабильном состоянии, поэтому он играет жизненно важную роль в метаболизме глюкозы в печени ([Gastaldelli et al., 2000](#); [Wu et al., 2018](#)). Убедительные доказательства указывают на то, что чрезмерно активированный глюконеогенез и липогенез в печени вносят вклад в патогенез метаболических нарушений, включая СД и НАЖБП ([Cui et al., 2018](#); [Dong et al., 2019](#); [Li et al., 2020](#)). Следовательно, одной из важных целей лечения СД2-НАЖБП является подавление токсичности гликолипидов, вызванной глюконеогенезом.

Потенциальный механизм возникновения и прогрессирования СД2-НАЖБП сложен и многофакторен, традиционная теория «двух ударов» подверглась сомнению, а взаимодействие различных патогенных факторов постепенно стало понятным ([Tilg et al., 2016](#)). В настоящее время многие исследования показали, что воспаление печени играет важную роль в развитии метаболических нарушений, вызванных СД2-НАЖБП ([Morrison and Kleemann, 2015](#); [Dewidar et al., 2020](#); [Gehrke and Schattenberg, 2020](#)). Поэтому очень важно найти безопасный и эффективный препарат для подавления воспаления печени и улучшения гипергликемии. Предполагается, что бициклол проявляет противовоспалительный эффект при различных заболеваниях печени ([Li and Gt, 2004](#)). В настоящих исследованиях бициклол использовался у здоровых крыс, крыс с НАЖБП и крыс с СД2-НАЖБП, по сравнению со здоровыми крысами и крысами с СД2-НАЖБП, наша работа показала, что бициклол может эффективно улучшать симптомы, связанные с СД2-НАЖБП, включая улучшение сигнала инсулина в печени, подавление усиления глюконеогенеза в печени и уменьшение повреждения печени за счет противовоспалительного механизма.

TNF- α и IL-1 β , классические воспалительные факторы, обладают функциями стимулирования воспаления, регулирования клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза ([Zelova and Hosek, 2013](#)). Известно, что некоторые из этих цитокинов изменяют метаболизм жирных кислот в печени. Наше исследование показало, что HFD увеличивает уровни TNF- α и IL-1 β в сыворотке и печени, аналогично исследованиям [Borowska et al. \(2016\)](#). Предполагают, что воспаление печени произошло у крыс с СД2-НАЖБП. После обработки бициклолом уровни TNF- α и IL-1 β были снижены, а патологические и ультраструктурные изменения ткани печени также ослаблены; показано, что бициклол заметно подавляет воспаление у крыс T2DM-NAFLD. Насколько нам известно, сывороточные уровни двух печеночных маркерных ферментов (АЛТ и АСТ) коррелируют с повреждением печени и диабетом. Здесь наши результаты показали, что бициклол может улучшить уровни АЛТ и АСТ, а это означает, что подавление воспаления может уменьшить повреждение печени. Воспаление считается важным этапом в патогенезе ИР ([Adabimohazab et al., 2016](#)). Более того, ИР и воспаление образуют порочный круг, каждое из которых способствует развитию другого и ускоряет развитие метаболических нарушений при наличии липотоксичности ([Tanase et al., 2020](#)). ИР обычно довольно выражен при СД2, но у пациентов с НАЖБП был выражен ИР, более тяжелый, чем у пациентов с СД2 без НАЖБП ([Kelley et al., 2003](#)). НОМА-ИР считается суррогатным маркером ИР, хотя зажим для гиперинсулинемии-эугликемии является золотым стандартом для оценки ИР, этот метод трудно применить в крупномасштабных

эпидемиологических исследованиях. Таким образом, HOMA-IR часто используется как косвенный индикатор чувствительности к инсулину. В нашем исследовании бициклол может заметно снижать уровень HOMA-IR, наши результаты показали, что бициклол может значительно ингибировать возникновение IR.

Когда возникает ИР, способность инсулина ингибировать глюкозу в печени снижается, глюконеогенез в печени увеличивается, что может быть вызвано переизбытком, снижением соотношения инсулин / глюкагон в воротной вене и / или нарушением передачи сигналов инсулина ([Roden, 2008](#)). Следовательно, мы можем обоснованно предположить, что имеется дефект инсулинового сигнального пути у крыс T2DM – NAFLD с высоким статусом IR. За последние пару десятилетий накопление доказательств показало, что Akt является центральным регулятором действия инсулина, а Akt играет важную роль в стимулировании поглощения глюкозы и роста, выживания и пролиферации клеток в ответ на цитокины и факторы роста ([Юдушкин, 2019](#)). . В этом исследовании уровень p-Akt / Akt у крыс с СД2-НАЖБП было снижено, показано, что активация Akt и сигнальный путь инсулина нарушены. Диверсификация путей передачи сигналов печеночного инсулина, по-видимому, происходит в значительной степени дистальнее активации Akt. Субстраты Akt включают GSK3, FOXO1, PGC-1 α и mTORC1, которые, в свою очередь, контролируют анаболическую программу, активирующую глюконеогенные гены, экспрессию липогенных генов и синтез белка ([Petersen and Shulman, 2018](#)). Активный PGC-1 α , ключевой регулятор выработки глюкозы в печени, может активировать экспрессию печеночных глюконеогенных генов, таких как PEPCK, избирательное ингибирование PGC-1 α , потенциально снижающее выработку глюкозы в печени и улучшающее печеночную инсулинорезистентность ([Fang et al., 2019](#)). Более того, было показано, что ингибирование Akt / PGC-1 α снижает экспрессию глюконеогенных генов, гликемию натощак и чувствительность печени к инсулину ([Sajan et al., 2015](#)). В настоящем исследовании мы обнаружили, что экспрессия PGC-1 α и PEPCK положительно коррелировала, что согласуется с предыдущими исследованиями. PEPCK является основным ферментом, ограничивающим скорость глюконеогенеза, наши результаты показали, что экспрессия PEPCK была увеличена у крыс T2DM-NAFLD, что способствует глюконеогенезу в печени, эти изменения могут быть ослаблены введением бициклола. Они предполагают, что bicycloil играет анти-глюконеогенез эффекты с помощью регулирования Akt / PGC-1 α выражения в инсулинорезистентностью состояний.

Глюконеогенез - это основной путь эндогенной глюкозы во время голодания или голодания, увеличение скорости печеночного глюконеогенеза вызовет нарушения регуляции гликогена, а затем гипергликемию. Текущие результаты показали, что бициклол снижает уровни FBG у крыс с T2DM-NAFLD, указывая на то, что бициклол может оказывать анти-гипергликемическое действие. Печень является передаточной станцией энергетического метаболизма, чрезмерное выделение гликогена вызовет превращение синтеза гликогена в липогенез, вызывая нарушение метаболизма липидов в печени. Многие промежуточные продукты метаболизма продуцируются во время патологического переизбытка, которые перенасыщают и постоянно активируют как липогенез в печени, так и глюконеогенез, в то же время увеличивая запасы липидов в печени ([Sun et al., 2012](#)). Как видно из некоторых исследований ([Hakimi et al., 2005](#)) передача сигналов PGC-1 α / PEPCK в печени играет ключевую роль в метаболизме липидов в печени, а PEPCK требуется не только для глюконеогенеза, но также для накопления липидов и стеатоза ([Fang et al., 2020](#)). Эти результаты еще раз доказали тесную связь между глюконеогенезом и метаболизмом липидов в печени. Стеатоз печени - еще одна важная гистопатологическая находка на модели крыс с СД2-НАЖБП. Исследования в нашей лаборатории показали, что бициклол может значительно улучшить дислипидемию и стеатоз печени у крыс с СД2-НАЖБП, включая снижение общего содержания холестерина, триглицеридов и внутripеченочного жира. Это предполагает, что глюконеогенез также играет важную роль в метаболизме глюкозы и липидов в печени. Однако из-за особенностей заболевания СД2, когда модель была создана, крысы СД2-НАЖБП продемонстрировали значительную потерю веса. Хотя диета с высоким содержанием жиров поддерживалась в течение

долгого времени, этого все же было неизбежно. Это сделало наши экспериментальные результаты необъективными,

Таким образом, введение бициклола снижает токсичность гликолипидов у крыс с СД2-НАЖБП. Кроме того, мы изучили возможные механизмы и предположили, что бициклол может регулировать глюконеогенную активность печени в основном за счет ингибирования воспаления через сигнальный путь Akt / PGC-1 α (рис. 8). Таким образом, наше исследование выявляет новую регуляторную сеть бициклола на глюконеогенез печени, в которой бициклол может быть новым терапевтическим подходом к лечению СД2-НАЖБП и других метаболических нарушений.

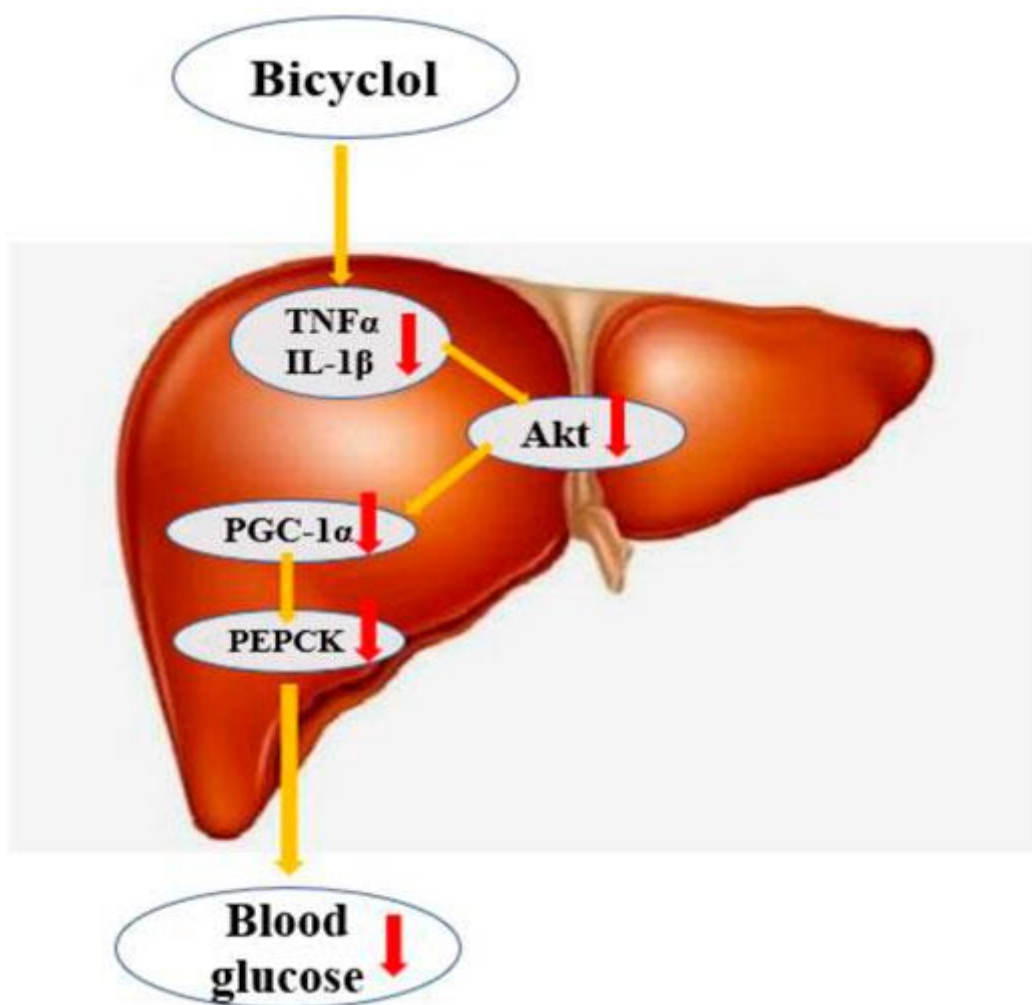


РИСУНОК 8 . Бициклол регулирует глюконеогенную активность печени, главным образом, за счет ингибирования воспаления и сигнального пути Akt / PGC-1 α .

Заявление о доступности данных

Оригинальные материалы, представленные в исследовании, включены в статью / дополнительные материалы, дальнейшие запросы можно направить соответствующему автору.

Заявление об этике

Исследование на животных было рассмотрено и одобрено Первой дочерней больницей Харбинского медицинского университета.

Вклад авторов

HL разработал и провел эксперименты, проанализировал данные и написал рукопись. QX, YH, ML и JX способствовали иммуногистохимии и вестерн-блоттингу. CX, KZ и ML внесли свой вклад в лечение животных и анализ данных. XY способствовал анализу данных. HK руководил исследованием и исправлял окончательный вариант.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что исследование проводилось при отсутствии каких-либо коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

использованная литература

Адабимохазаб Р., Гарфинкель А., Милам Е.К., Фрош О., Мангоне А. и Конвит А. (2016). Опосредует ли воспаление связь между ожирением и резистентностью к инсулину ?. *Воспаление* 39, 994–1003. DOI: 10.1007 / s10753-016-0329-z

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Borowska, M., dworacka, M., Wesołowska, A., Winiarska, H., Krzyżagórska, E., and Grzegorz, D. (2016). Влияние фармакотерапии сахарного диабета 2 типа на секрецию IL-1 β , IL-6 и IL-10. *Фармакология* 97, 189–194. DOI: 10.1159 / 000443897

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Цуй, Х., Тан, Дж., Ши, Ю., Сан, К., Ли, Й., Цзи, К., и др. (2018). Длинная некодирующая РНК Gm10768 активирует глюконеогенез в печени путем секвестрации микроРНК-214 у мышей. *J. Biol. Chem.* 293, 4097–4109. DOI: 10.1074 / jbc.M117.812818

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Де Соуза, Колорадо, Кураути, Массачусетс, Сильва Фде, Ф., Де Мораис, Х., Кури, Р., Хирабара, С.М., и др. (2015). Целекоксиб и ибупрофен восстанавливают содержание АТФ и активность глюконеогенеза в печени крыс с опухолями Walker-256. *Cell Physiol. Biochem.* 36, 1659–1669. DOI: 10.1159 / 000430326

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Девидар Б., Каль С., Пафили К. и Роден М. (2020). Метаболическая болезнь печени при диабете - от механизмов до клинических испытаний. *Метаболизм* 111S, 154299. doi: 10.1016 / j.metabol.2020.154299

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Донг Р., Ян Х., Ван Ч., Лю К., Лю З., Ма Х. и др. (2019). Янгонин защищает от неалкогольной жирной болезни печени через рецептор фарнезоида X. *Фитомедицина* 53, 134–142. DOI: 10.1016 / j.phymed.2018.09.006

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Фанг, П., Сунь, Ю., Гу, Х., Хан, Л., Хан, С., Шан, Ю., и др. (2020). San-Huang-Tang защищает НАЖБП, вызванную ожирением / диабетом, за счет усиления передачи сигналов PGC-1 α / PEPCK в моделях мышей с ожирением и нокаутом Galr1. *J. Ethnopharmacol.* 250, 112483. doi: 10.1016 / j.jep.2019.112483

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Фанг, П., Сунь, Ю., Гу, Х., Ши, М., Бо, П., Чжан, З. и др. (2019). Байкалин улучшает резистентность к инсулину печени и глюконеогенную активность за счет ингибирования пути P38 MAPK / PGC-1alpha. *Фитомедицина* 64, 153074. doi: 10.1016 / j.phymed.2019.153074

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Фенеберг А., Малфертхайнер П. (2012). Эпидемические тенденции ожирения с влиянием на метаболизм и заболевания пищеварительной системы. *Копать землю. Дис.* 30, 143–147. DOI: 10.1159 / 000336660

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Гасталделли А., Балди С., Петтити М., Тоски С., Камастра А., Натали Б. Р. и др. (2000). Влияние ожирения и диабета 2 типа на глюконеогенез и выход глюкозы у людей: количественное исследование. *Диабет* 49, 1367–1373. DOI: 10.2337 / диабет.49.8.1367

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Герке, Н., Шаттенберг, Дж. М. (2020). Метаболическое воспаление - роль воспалительных путей печени как движущие силы сопутствующих заболеваний при неалкогольной жировой болезни печени ?. *Гастроэнтерология* 158, 1929–1947. DOI: 10.1053 / j.gastro.2020.02.020

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Гирибабу Н., Карим К., Килари Е.К., Кассим Н.М. и Саллех Н. (2018). Противовоспалительное, антиапоптотическое и пропролиферативное действие этанольного экстракта семян *Vitis vinifera* в печени при диабете 2 типа, индуцированном стрептозотоцином и никотинамидом, у самцов крыс. *Может. J. Diabetes* 42, 138–149. DOI: 10.1016 / j.jcjd.2017.04.005

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Джувьяно Д., Черриелло А. и Эспозито К. (2008). Метаболизм глюкозы и гипергликемия. *Являюсь. J. Clin. Nutr.* 87, 217С – 222С. DOI: 10.1093 / ajcn / 87.1.217S

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Hakimi, P., Johnson, MT, Yang, J., Lepage, DF, Conlon, RA, Kalhan, SC, et al. (2005). Фосфоенолпируваткарбоксихиназа и критическая роль катаплероза в контроле метаболизма печени. *Nutr. Метаб. (Лондон)* 2, 33. DOI: 10.1186 / 1743-7075-2-33

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Хан, Ю., Ши, JP, Ма, А.Л., Сюй, Ю., Дин, XD, и Фань, JG (2014). Рандомизированное контролируемое исследование бициклола плюс метформина у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени с нарушением уровня глюкозы натощак. *Clin. Исследование наркотиков.* 34, 1–7. DOI: 10.1007 / s40261-013-0136-3

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Канг Х., Хан К. и Чой М. (2014). Математическая модель регуляции уровня глюкозы в системе всего тела. *Островки* 4, 84–93. DOI: 10.4161 / isl.19505

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Kelley, De., Mckolanis, Tm., Ra, Hegazi., Lh, Kuller., And Sc, K. (2003). Жирная печень при сахарном диабете 2 типа: связь с региональным ожирением, жирными кислотами и резистентностью к инсулину. *Являюсь. J. Physiol. Эндокринолог. Метаб.* 285, 906–916. DOI: 10.1152 / ajpendo.00117.2003

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Ландау, Б.Р., Варен, Дж., Чандрамули, В., Шуман, В.К., Экберг, К., и Калхан, С.К. (1996). Вклад глюконеогенеза в выработку глюкозы в голодном состоянии. *J. Clin. Вкладывать деньги*. 98, 378–385.

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Лейте, Северная Каролина, Вьегас, ВВ, Виллела-Ногейра, Калифорния, Карлос, ФО, Кардосо, CRL, и Саллес, GF (2019). Эффективность диацереина в снижении стеатоза и фиброза печени у пациентов с диабетом 2 типа и неалкогольной жировой болезнью печени: рандомизированное плацебо-контролируемое исследование. *Диабет Ожирение. Метаб.* 21, 1266–1270. DOI: 10.1111 / dom.13643

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Ли, М., и Гт, Л. (2004). Ингибирование экспрессии мРНК Fas / FasL и высвобождения TNF-α при индуцированном конканавалином А повреждении печени у мышей бициклолом. *Мир J. Gastroenterol.* 10, 1775–1779. DOI: 10.3748 / wjg.v10.i12.1775

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Ли, Т., Хуанг, Х., Юэ, З., Мэн, Л., и Ху, Ю. (2020). Нокдаун длинной некодирующей РНК Gm10804 подавляет нарушения метаболизма глюкозы и липидов в печени при диабете с неалкогольной жировой болезнью печени. *Cell Biochem. Funct.* 38, 839–846. DOI: 10.1002 / cbf.3495

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Моррисон, М.С., и Климанн, Р. (2015). Роль фактора ингибирования миграции макрофагов при ожирении, инсулинорезистентности, диабете 2 типа и сопутствующих заболеваниях печени: всесторонний обзор исследований на людях и грызунах. *Фронт. Иммунол.* 6, 308. DOI: 10.3389 / fimmu.2015.00308

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Пак, Х.Дж., Юнг, У.Дж., Чо, С.Дж., Юнг, ХК, Шим, С., и Чой, М.С. (2013). Экстракт кожуры цитрусовых Уншиу уменьшает гипергликемию и стеатоз печени за счет изменения воспаления и ферментов, регулирующих уровень глюкозы и липидов в печени у мышей Db / db. *J. Nutr. Biochem.* 24, 419–427. DOI: 10.1016 / j.jnutbio.2011.12.009

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Петерсен, М.С., и Шульман, Г.И. (2018). Механизмы действия инсулина и инсулинорезистентности. *Physiol. Ред.* 98, 2133–2223. DOI: 10.1152 / Physrev.00063.2017

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Роден, М. (2008). Производство глюкозы в печени и инсулинорезистентность. *Wien. Med. Wochenschr.* 158, 558–561. DOI: 10.1007 / s10354-008-0595-y

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Саджан, член парламента, Айви, Р.А., и Фарез, Р.В. (2015). Связанное с ИМТ прогрессирование атипичных РКС-зависимых aberrаций в передаче сигналов инсулина через IRS-1, Akt, FoxO1 и PGC-1α в печени людей с ожирением и диабетом 2 типа. *Метаболизм* 64, 1454–1465. DOI: 10.1016 / j.metabol.2015.08.011

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Sun, Z., Miller, RA, Patel, RT, Chen, J., Dhir, R., Wang, H., et al. (2012). Печеночный Hdc3 способствует глюконеогенезу, подавляя синтез и секвестрацию липидов. *Nat. Med.* 18, 934–942. DOI: 10.1038 / nm.2744

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Такахаша Ю., Соедзима Ю., Фукусато Т. (2012). Модели на животных неалкогольной жировой болезни печени / неалкогольного стеатогепатита. *Мир J. Gastroenterol.* 18, 2300–2308. DOI: 10.3748 / wjg.v18.i19.2300

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Tanase, DM, Gosav, EM, Costea, CF, Ciocoiu, M., Lacatusu, CM, Maranduca, MA, et al. (2020). Сложная взаимосвязь между сахарным диабетом 2 типа (СД2), инсулинорезистентностью (ИР) и неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП). *J. Diabetes Res.* 2020, 3920196. DOI: 10.1155 / 2020/3920196

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Тан, Н.Н., и Ньюсом, П.Н. (2015). Краткий обзор безалкогольной жировой болезни печени. *Атеросклероз* 239, 192–202. DOI: 10.1016 / j.atherosclerosis.2015.01.001

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Тилг, Х., Мошен, AP, и Роден, М. (2016). НАЖБП и сахарный диабет. *Nat. Преподобный Гастроэнтерол. Гепатол.* 14, 32–42. DOI: 10.1038 / nrgastro.2016.147

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Ву, ХМ, Рен, Т., Лю, JF, Лю, YJ, Ян, LC, и Jin, X. (2018). Экстракт *Vernonia Amygdalina Delile* подавляет глюконеогенез в печени за счет активации аденозин-5' монофосфокиназы. *Биомед. Фармакотер.* 103, 1384–1391. DOI: 10.1016 / j.biopha.2018.04.135

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Юноси, З.М., Голаби, П., Де Авила, Л., Пайк, Дж. М., Сришорд, М., Фукуи, Н. и др. (2019). Глобальная эпидемиология НАЖБП и НАСГ у пациентов с диабетом 2 типа: систематический обзор и метаанализ. *J. Hepatol.* 71, 793–801. DOI: 10.1016 / j.jhep.2019.06.021

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Юноси, З.М., Кениг, А.Б., Абделатиф, Д., Фазель, Ю., Генри, Л., и Ваймер, М. (2016). Глобальная эпидемиология неалкогольной жировой болезни печени - метааналитическая оценка распространенности, заболеваемости и исходов. *Гепатология* 64, 73–84. DOI: 10.1002 / hep.28431

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Юдушкин, И. (2019). Собираем Акт вместе: руководство внутриклеточной активностью Акт с помощью Р1ЗК. *Биомолекулы* 9, 121. doi: 10.3390 / biom9020067

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Зелова Х., Хосек Дж. (2013). TNF-альфа-сигнализация и воспаление: взаимодействие между старыми знакомыми. *Воспаление. Res.* 62, 641–651. DOI: 10.1007 / s00011-013-0633-0

[PubMed Аннотация](#) | [CrossRef Полный текст](#) | [Google Scholar](#)

Ключевые слова: бицикллол, СД2, НАЖБП, воспаление, глюконеогенез в печени.

Образец цитирования: Li H, Xu Q, Xu C, Hu Y, Yu X, Zhao K, Li M, Li M, Xu J и Kuang H (2021) Бициклом регулирует глюконеогенез в печени у крыс с диабетом 2 типа и безалкогольной жирной печенью. Заболевание, подавляющее воспаление. *Фронт. Pharmacol.* 12: 644129. DOI: 10.3389 / fphar.2021.644129

Поступило: 20 декабря 2020 г.; **Принята в печать:** 04 мая 2021 года;
Опубликовано: 21 мая 2021 г.

Отредактировано:

[Капассо Раффаэле](#), Неаполитанский университет имени Федерико II, Италия

Рассмотрено:

[Джованни Тарантино](#), Неаполитанский университет Федерико II, Италия
[Гекче Чекер Каратопрак](#), Университет Эрджиес, Турция