

УДК 577.15:616.379-008.64

Интенсивность свободнорадикальных процессов в печени крыс при сахарном диабете 2 типа и введении эпифамина

Т. Н. Попова, А. А. Агарков, А. Н. Веревкин*

Воронежский государственный университет, 394006, Воронеж, Университетская пл., 1

*E-mail: wer.all@mail.ru

Поступила в редакцию 25.04.2013

РЕФЕРАТ Проведено исследование влияния эпифамина на интенсивность свободнорадикальных процессов, активности каспаз-1 и -3, аконитатгидратазы и на содержание цитрата в печени крыс при экспериментально индуцированном сахарном диабете 2 типа (СД2). Установлено, что под действием эпифамина при СД2 происходит изменение параметров биохемилюминесценции, соответствующее снижению интенсивности свободнорадикальных процессов, а также изменение активности аконитазы и содержания цитрата в сторону значений, характерных для контрольных животных. Активности каспазы-1 и каспазы-3 в печени крыс с СД2, которым вводили эпифамин, были соответственно в 2.4 и 1.6 раза ниже, чем в отсутствие эпифамина. По-видимому, эпифамин-опосредованная коррекция свободнорадикального гомеостаза при СД2 связана с регуляцией уровня мелатонина – гормона, обладающего выраженной антиоксидантной активностью.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА сахарный диабет 2 типа, биохемилюминесценция, аконитатгидратаза, цитрат, каспаза, эпифамин.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АГ – аконитатгидратаза; АФК – активные формы кислорода; БХЛ – биохемилюминесценция; СД2 – сахарный диабет 2 типа.

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет является одним из социально значимых заболеваний и остается актуальной проблемой как для медицинской науки, так и для здравоохранения. Среди всех случаев данной патологии более 90% приходится на СД2.

В патогенезе осложнений СД2 существенная роль принадлежит свободнорадикальному окислению биомолекул. Скорость образования свободных радикалов при СД2 зависит от скорости гликозилирования белков, а следовательно, и от степени гипергликемии [1]. Одной из причин усиления свободнорадикальных процессов при СД2 может являться активация полиолового шунта, функционирование которого связано с превращением глюкозы в сорбитол с участием альдозоредуктазы. В условиях гипергликемии свободные радикалы также образуются в процессе аутоокисления глюкозы при формировании конечных продуктов гликозилирования, которые, в свою очередь, участвуют в патогенезе ангиопатий, способствуют нарастанию ишемии и интенсификации свободнорадикальных процессов в тканях при СД2 [1]. Усиление гликозилирования гемоглобина приводит к вторичной тканевой гипоксии [2].

Нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза при СД2 может являться причиной акти-

вации процессов запрограммированной клеточной гибели – апоптоза, характеризующегося активацией каскада внутриклеточных цистеиновых протеаз, известных как каспазы. Каспазы – семейство эволюционно консервативных протеаз, специфически расщепляющих белки после остатков аспарагиновой кислоты [3]. В частности, с участием каспазы-3 подвергается протеолизу ингибитор ДНКазы, ответственной за фрагментацию ДНК (CAD). Каспазы вызывают также гидролиз белков ламин, армирующих ядерную мембрану, что ведет к конденсации хроматина. Они участвуют в разрушении белков, поддерживающих структурно-функциональное состояние цитоскелета, а также в инактивации и нарушении регуляции белков, участвующих в репарации ДНК, сплайсинге мРНК и репликации ДНК. При этом ключевой каспазой является каспаза-3 (crr32), и оценка активности каспазы-3 – один из основных методов определения уровня апоптоза в ткани [4]. Кроме того, важной характеристикой процесса апоптоза является активность каспазы-1 (ICE), относящейся к группе каспаз-активаторов цитокинов.

Известно, что одна из чувствительных мишеней действия свободных радикалов – это аконитатгидратаза (АГ), выполняющая основную роль в регуляции накопления цитрата [5]. Показано, что в условиях

активации свободнорадикального окисления регуляция активности АГ претерпевает существенные изменения, происходит угнетение активности фермента и накопление цитрата, являющегося низкомолекулярным антиоксидантом вследствие хелатирующих свойств по отношению к ионам Fe^{2+} [6]. Ионы Fe^{2+} , как известно, обладают прооксидантной активностью, так как, участвуя в реакциях Фентона и Хабера–Вайса, приводят к образованию одной из наиболее агрессивных и опасных активных форм кислорода (АФК) – гидроксильного радикала [7].

Актуальным является применение препаратов, способных снижать интенсивность свободнорадикальных процессов в организме. Препарат эпифамин – пептидный биорегулятор, тропный к эпителиально-эпифизарной области. Он относится к классу цитомединов. Эти пептиды не только оказывают положительное действие на иммунную систему, нормализуют жировой и углеводный обмен, но также способны осуществлять коррекцию уровня эндогенного мелатонина [8, 9]. Один из основных биохимических механизмов действия мелатонина на клетки – антиоксидантный. Мелатонин является активным донором электронов, а также эффективным перехватчиком радикалов: $OH\cdot$, $OOH\cdot$, $O_2^{\cdot-}$, синглетного кислорода, $NO\cdot$, $ONOO^-$ [10]. В отличие от большинства других внутриклеточных антиоксидантов, локализующихся преимущественно в определенных клеточных структурах, присутствие мелатонина и, следовательно, его антиоксидантная активность определены во всех клеточных структурах, включая ядро [11]. Этот факт свидетельствует об универсальности антиоксидантного действия мелатонина, а также выраженных протективных свойствах, обеспечивающих защиту от свободнорадикального повреждения ДНК, белков и липидов.

В данной работе проведено исследование влияния эпифамина на интенсивность свободнорадикальных процессов, активности каспаз-1 и -3, аконитатгидратазы и на содержание цитрата в печени крыс с экспериментальным СД2.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объекта исследования использовали белых крыс-самцов (*Rattus rattus* L.) массой 150–200 г. Все экспериментальные процедуры были выполнены в соответствии с правилами гуманного обращения с лабораторными животными и в соответствии с санитарными правилами для вивария. СД2 индуцировали внутримышечным введением протамина сульфата в течение 3 недель в дозе 10 мг/кг массы тела животного в объеме 0.5 мл 0.9% NaCl 3 раза в сутки [12].

В ходе эксперимента животные были разделены на три группы: группу 1 ($n = 8$) составляли контроль-

ные животные; группу 2 ($n = 8$) – животные с СД2; в группе 3 ($n = 8$) животным с СД2 внутривенно вводили эпифамин в виде раствора в 1 мл 0.9% раствора NaCl трижды в день в дозе 2.5 мг/кг на 15, 17 и 19 день эксперимента. Через 3 недели после начала индуцирования СД2 наркотизированных животных всех экспериментальных групп умерщвляли и использовали для дальнейших исследований. Для извлечения печени крысам под наркозом производили лапаротомию, затем под портальную вену подводили лигатуру, надсекали и канюлировали ее на 10 мм ниже синуса, переднюю полую вену пересекали в диафрагмальной области и перфузировали печень ледяным изотоническим раствором со скоростью 5 мл/мин в течение 5 мин. Навеску ткани гомогенизировали путем растирания ткани в фарфоровой ступке с кварцевым песком в 4-кратном объеме охлажденной среды выделения. Среда имела следующий состав: 0.1 М Трис-НСl-буфер (рН 7.8), содержащий 1 мМ EDTA и 1% β -меркаптоэтанол. Гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 12 мин. Супернатант использовали для исследования.

Содержание глюкозы в сыворотке крови крыс определяли глюкозооксидазным методом с помощью набора реактивов «ГЛЮКОЗА-12-ВИТАЛ» (производитель ООО «Витал-Диагностикс», СПб., Россия). Пробы крови брали из хвостовой вены на 15, 17 и 19 день эксперимента [13]. Сыворотку получали кратковременным центрифугированием.

Для определения интенсивности свободнорадикальных процессов применяли метод индуцированной биохемилюминесценции (БХЛ) [14]. Кинетическую кривую БХЛ регистрировали на биохемилюминометре БХЛ-07 с программным обеспечением в течение 30 с и определяли следующие параметры: светосумму хемилюминесценции (S), соответствующую площади под кривой хемилюминесценции; интенсивность максимальной вспышки (I_{max}) – максимальное значение на кривой биохемилюминесценции, характеризующие интенсивность свободнорадикальных процессов, а также величину тангенса угла наклона касательной к кривой хода БХЛ ($tg\alpha_2$), характеризующую общую антиоксидантную активность.

Среда для определения интенсивности БХЛ имела следующий состав: 0.4 мл 0.02 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7.5), 0.4 мл 0.01 мМ $FeSO_4$ и 0.2 мл 2% раствора пероксида водорода (вносимого непосредственно перед измерением). Исследуемый материал вносили в количестве 0.1 мл непосредственно перед измерением до внесения пероксида водорода.

Определение активности каспаз-1 и -3 проводили с помощью набора реактивов Caspase 1 Assay Kit, Colorimetric и Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric соответственно (Sigma) на спектрофотометре Hitachi

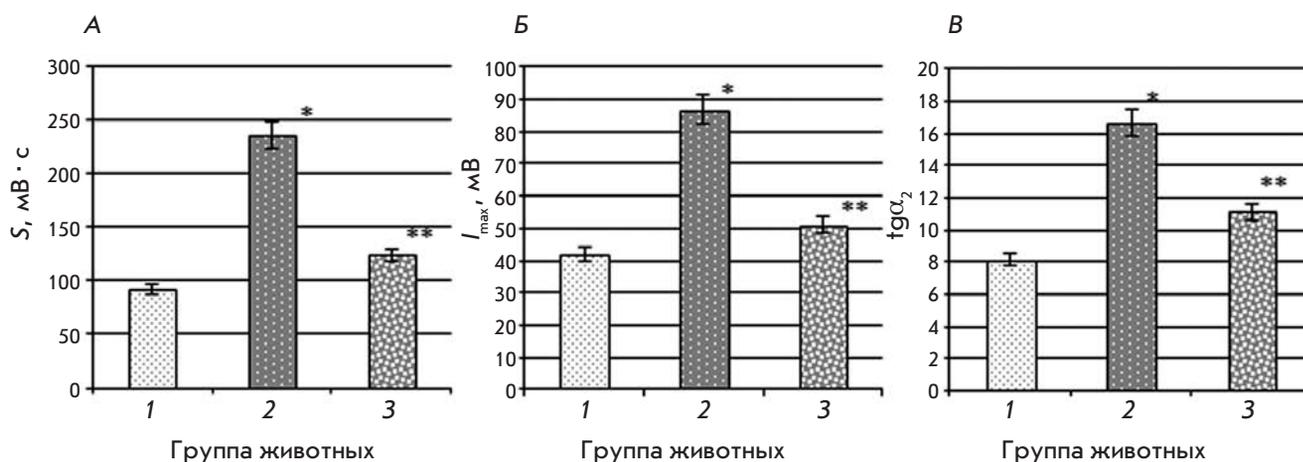


Рис. 1. Параметры биофлуоресценции: светосумма медленной вспышки (S) (А), интенсивность максимальной вспышки (I_{\max}) (Б), тангенс угла наклона касательной к кинетической кривой хода биофлуоресценции ($\text{tg}\alpha_2$) (В) в печени крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа, СД2 (2) и при введении эпифамина животным с СД2 (3). Различия статистически достоверны при $p \leq 0.05$: * – по сравнению с контрольной группой, ** – по сравнению с группой с СД2

U1900 с программным обеспечением. Колориметрический анализ активности каспаз основан на гидролизе пептидного субстрата ацетил-Тур-Val-Ala-Asp-*n*-нитроанилида (Ac-YVAD-pNA) (в случае каспазы-1) и ацетил-Asp-Glu-Val-Asp-*n*-нитроанилида (Ac-DEVD-pNA) (в случае каспазы-3) с образованием *n*-нитроанилина, имеющего максимум поглощения при 405 нм (молярный коэффициент поглощения = 10.5). Активность каспаз выражали в пикомолях продукта, образующегося в 1 мин, в расчете на 1 мг белка.

Активность АГ определяли на спектрофотометре Hitachi U1900 при длине волны 233 нм. О скорости дегидратации цитрата в ходе АГ-реакции судили по возрастанию оптической плотности в результате образования двойной связи в молекуле *цис*-аконитата. Определение активности АГ проводили в 50 мМ Трис-НСl-буфере, рН 7.8, содержащем 0.15 мМ цитрат. За единицу ферментативной активности (Е) принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль продукта реакции за 1 мин при температуре 25°C.

Количество цитрата определяли по методу Нательсона [15]. В основе метода лежит реакция бромирования цитрата в присутствии перманганата калия с образованием пентабромацетона, который образует окрашенный комплекс с тиомочевинной. Интенсивность окраски этого соединения измеряли спектрофотометрически при длине волны 430 нм на спектрофотометре Hitachi U1900. Расчет производили по калибровочной кривой.

Общий белок определяли биуретовым методом. Статистическую достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Статистически достоверными считали различия при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что введение протамина сульфата экспериментальным животным приводило к увеличению содержания глюкозы в сыворотке крови. Использование эпифамина в качестве протектора способствовало снижению уровня гипергликемии у крыс с экспериментально индуцированным СД2: на 19 сут после начала эксперимента содержание глюкозы в крови у животных с СД2, получавших эпифамин, было в 1.8 раза ниже, чем у больных животных, не получавших эпифамин (таблица). Это может быть связано со способностью эпифамина увеличивать уровень мелатонина в организме. Как известно, мелатонин способен стимулировать транспорт глюкозы в скелетные мышцы, активируя IRS-1/PI-3-киназный путь, в результате чего снижается содержание глюкозы в крови [16].

Согласно полученным данным, значения светосуммы БХЛ (S) и интенсивности максимальной вспышки БХЛ (I_{\max}) в печени крыс с СД2 в 2.6 и 2.1 раза превышали соответствующие показатели у контрольных животных (рис. 1А, Б), что свидетельствует о возрастании интенсивности свободнорадикального окисления. Согласно данным литературы, при СД2 имеет место активация полиолового пути, в котором глюкоза превращается в сорбитол с участием альдозо-

Концентрация глюкозы в сыворотке крови крыс экспериментальных групп животных на 15, 17 и 19 день эксперимента

Группа животных	Концентрация глюкозы, мМ		
	15 день	17 день	19 день
1 (контроль)	5.00 ± 0.24	5.26 ± 0.23	5.5 ± 0.26
2	9.02 ± 0.41	9.72 ± 0.43	13.74 ± 0.64
3	8.18 ± 0.38	7.92 ± 0.36	7.71 ± 0.34

редуктазы. Под действием сорбитолдегидрогеназы сорбитол превращается во фруктозу, что сопровождается увеличением соотношения NADH/NAD⁺, как и при развитии тканевой гипоксии. Данное состояние получило название «редуктивный стресс», или «гипергликемическая псевдогипоксия» [2]. Следствием данного состояния может быть изменение степени восстановленности компонентов электрон-транспортной цепи, приводящее к повышению вероятности образования АФК.

В печени животных с СД2 выявлено также увеличение в 2.1 раза по сравнению с контрольными животными значения tgα₂ – параметра БХЛ, характеризующего общую антиоксидантную активность (рис. 1В). Введение эпифамина крысам с СД2 приводило к снижению значений S и I_{max} в печени в 1.9 и 1.7 раза соответственно (рис. 1А,Б). Регистрируемое снижение уровня свободнорадикального окисления может быть результатом проявления антиоксидантных свойств мелатонина, уровень которого способен регулировать эпифамин. Согласно литературным данным, мелатонин может взаимодействовать с рядом активных кислородных метаболитов, в частности,

нейтрализовать гидроксильный радикал – одну из самых реакционноспособных АФК [10, 17].

Кроме того, у животных с СД2, получавших эпифамин, значения tgα₂ были в 1.5 раза ниже, чем у больных животных, не получавших эпифамина. Это, очевидно, связано с уменьшением степени мобилизации антиоксидантной системы вследствие торможения свободнорадикальных процессов.

Установлено, что в печени животных с экспериментальным СД2 происходит увеличение удельной активности каспазы-1 в 6.0 раза, каспазы-3 – в 2.7 раза (рис. 2). Это свидетельствует об усилении апоптотических процессов в клетках печени. Повышение активности каспазы-3 в печени крыс также отмечено при действии четыреххлористого углерода [18].

При введении эпифамина животным с СД2 наблюдалось уменьшение активности каспазы-1 в печени в 2.4 раза, каспазы-3 – в 1.6 раза по сравнению с соответствующими значениями у животных с СД2, не получавших эпифамина (рис. 2).

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о снижении уровня апоптотических процессов в печени крыс с СД2 при действии эпифамина,

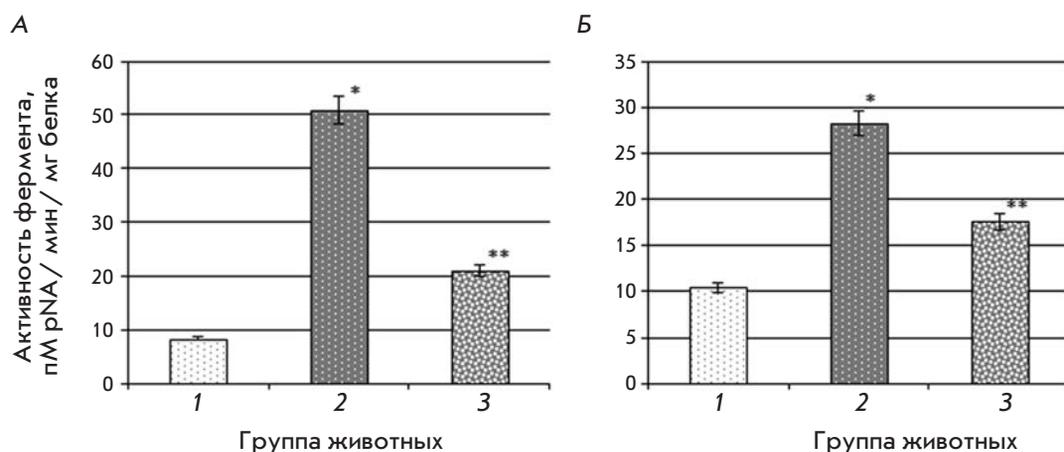


Рис. 2. Активность каспазы-1 (А) и каспазы-3 (Б) в печени крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа, СД2 (2) и при введении эпифамина животным с СД2 (3). Различия статистически достоверны при $p \leq 0.05$: * – по сравнению с контрольной группой, ** – по сравнению с группой с СД2

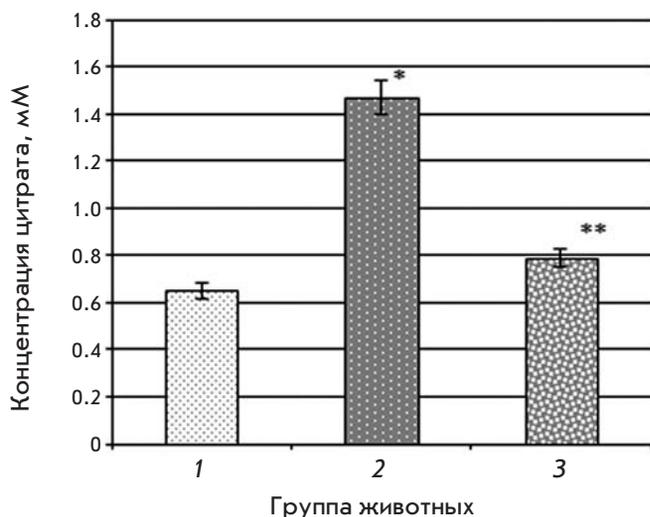


Рис. 3. Содержание цитрата в печени крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа, СД2 (2) и при введении эпифамина животным с СД2 (3). Различия статистически достоверны при $p \leq 0.05$: * – по сравнению с контрольной группой, ** – по сравнению с группой с СД2

что, возможно, связано со снижением скорости свободнорадикальных процессов при введении эпифамина.

Результаты проведенных исследований показали, что при СД2 в печени крыс происходит увеличение содержания цитрата в 2.3 раза (рис. 3) по сравнению с контрольными значениями. Также наблюдалось снижение удельной активности аконитазы в печени животных с СД2 в 1.9 раза и активности, выраженной в виде Е/г сырой массы, в 1.5 раза относительно контроля (рис. 4). Известно, что активность АГ может служить маркером окислительного стресса, так как под действием АФК фермент теряет активность вследствие окислительной модификации активного центра и высвобождения атома железа из железосерного кластера [5]. Полученные данные об изменении активности АГ и уровня цитрата при СД2 согласуются с результатами измерения параметров БХЛ, подтверждающими, что в условиях развития СД2 наблюдается интенсификация свободнорадикального окисления.

Введение эпифамина крысам с СД2 приводило к снижению уровня цитрата в печени в 1.9 раза (рис. 3) и увеличению в 1.6 раза удельной активности АГ (рис. 4А) по сравнению с соответствующими показателями у животных с СД2, не получавших эпифамин. Активность АГ, выраженная в Е/г сырой массы печени, также увеличилась в 1.4 раза по сравнению со

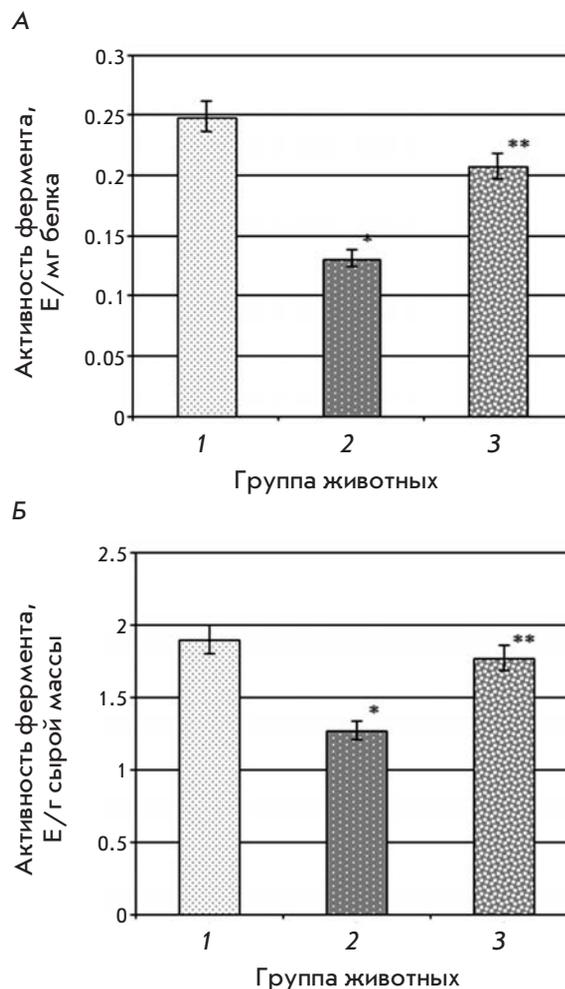


Рис. 4. Активность аконитатгидратазы, выраженная в Е/мг белка (А) и в Е/г сырой массы (Б), в печени крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа, СД2 (2) и при введении эпифамина животным с СД2 (3). Различия статистически достоверны при $p \leq 0.05$: * – по сравнению с контрольной группой, ** – по сравнению с группой с СД2

второй экспериментальной группой (рис. 4Б). Изменение исследуемых параметров в сторону контрольных значений при введении эпифамина животным с СД2, очевидно, свидетельствует о снижении уровня окислительного стресса, что ведет к реконструкции активного центра АГ и утилизации цитрата в катализируемой АГ реакции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные указывают на способность эпифамина оказывать позитивное регулирующее воздействие на свободнорадикальный гомеостаз путем снижения степени выраженности окислительного

стресса при экспериментальном СД2 у крыс. Об этом свидетельствует изменение в сторону нормы показателей БХЛ – I_{\max} и S , характеризующих интенсивность свободнорадикальных процессов, значений $\text{tg}\alpha_2$, отражающих общую антиоксидантную актив-

ность; активностей каспазы-1 и каспазы-3, свидетельствующих о скорости апоптотических процессов, а также активности АГ и уровня цитрата в печени крыс с СД2. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М. // Проблемы эндокринологии. 2000. № 6. С. 29–34.
2. Baynes J.W., Thorpe J.W. // Diabetes. 1999. V. 48. P. 1–9.
3. Куцый М.П., Кузнецова Е.А., Газиев А.И. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 149–163.
4. Woo M., Hakem R., Soengas M.S., Duncan G.S., Shahinian A., Kägi D., Hakem A., McCurrach M., Khoo W., Kaufman S.A., et al. // Genes Dev. 1998. V. 12. P. 806–819.
5. Gardner P.R., Nguyen D.M., White C.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. № 25. P. 12248–12252.
6. Cadet E., Gadenne M., Capron D., Rochette J. // Rev. Med. Interne. 2005. V. 26. P. 315–324.
7. Кухтина Е.Н., Глущенко Н.Н. // Биохимия. 1996. Т. 61. № 6. С. 993–997.
8. Хавинсон В.Х., Кветной И.М., Южаков В.В., Попучиев В.В., Коновалов С.С. Пептидергическая регуляция гомеостаза. СПб.: Наука, 2003. 194 с.
9. Anisimov V.N., Khavinson V.Kh. // Aging interventions and therapies / Ed. Suresh I.S. Rattan. Singapore: World Scientific, 2005. P. 127–146.
10. Reiter R.J., Tan D.X., Osuna C., Gitto E. // J. Biomed. Sci. 2000. V. 7. № 6. P. 444–458.
11. Reiter R.J., Acuña-Castroviejo D., Tan D.X., Burkhardt S. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2001. V. 939. P. 200–215.
12. Ульянов А.М., Тарасов Ю.А. // Вопросы мед. химии. 2000. Т. 46. № 2. С. 149–154.
13. Богомолов А.Ф., Лукьянов И.Ю., Горбачева Л.Р. Методические рекомендации по курсу экспериментальной физиологии для студентов биологического отделения биологического факультета. Иваново: Ивановский гос. ун-т, 2005. 43 с.
14. Кузьмина Е.И., Нелюбин А.С., Щенникова М.К. // Биохимия и биофизика микроорганизмов: Межвузовский сб. Горький, 1983. С. 179–183.
15. Афанасьев В.Г., Зайцев В.С., Вольфсон Т.И. // Лаб. дело. 1973. № 4. С. 115–116.
16. Ha E., Yim S.V., Chung J.H., Yoon K.S., Kang I., Cho Y.H., Baik H.H. // J. Pineal Res. 2006. V. 41. № 1. P. 67–72.
17. Peschke E. // J. Pineal Res. 2008. V. 44. № 1. P. 26–40.
18. Лемза С.В., Ажунова Т.А., Мондодоев А.Г., Николаев С.М., Разуваева Я.Г., Занданов А.О. // Бюл. ВШЦ СО РАМН. 2010. Т. 72. № 2. С. 181–184.