

Влияние аллоксана на систему глутатиона и окислительную модификацию белков в адипоцитах при экспериментальном диабете

Иванов В.В., Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Новицкий В.В.

Effect of alloxan on glutathione system and oxidative protein modification in adipocytes of rats at experimental diabetes

Ivanov V.V., Shakhristova Ye.V., Stepovaya Ye.A., Novitsky V.V.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Иванов В.В., Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Новицкий В.В.

Представлены результаты исследования развития окислительного стресса, состояния глутатионзависимой системы антиоксидантной защиты в адипоцитах эпидидимальной жировой ткани крыс на фоне введения аллоксана. Развитие окислительного стресса в адипоцитах характеризовалось увеличением концентраций гидроперекисей липидов, продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, и карбонильных производных белков. В этих условиях существенно изменялось редокс-состояние в адипоцитах, что было обусловлено уменьшением содержания восстановленной формы глутатиона и тенденцией к повышению содержания глутатиондисульфида, снижением величины соотношения восстановленной и окисленной форм трипептида. Повреждение белковых молекул при окислительном стрессе может привести к нарушению трансдукции инсулинового сигнала и возникновению инсулинорезистентности в жировой ткани.

Ключевые слова: аллоксановый диабет, адипоцит, карбонильные производные белков, глутатион.

There was carried out a research of the development of oxidative stress, the condition of glutathione dependant system of antioxidant protection in adipocytes of epididymal adipose tissue of rats when injecting alloxan. The development of oxidative stress in adipocytes was characterized by the increase of lipids hydroperoxide concentration, products reacting with thiobarbituric acid, and the increase of carbonyl derived protein. Redox-condition in adipocytes was considerably changing that was specified by the decrease of the content of the reduced form of glutathione and tendency to the increase of glutathione disulfide content, decrease of ratio between reduced and oxidized forms of threepeptide. Damage of protein molecule at oxidative stress may lead to the abnormality of transduction of insulinic signal and appearance of insulin resistance in adipose tissue.

Key words: alloxan diabetes, adipocyte, carbonyl derived protein, glutathione.

УДК 616.379-008.64:612.08:577.125.044:547.854.6

Введение

При сахарном диабете 1-го и 2-го типов в адипоцитах возникает окислительный стресс (ОС), который характеризуется увеличением содержания продуктов липидной перекисидации и окислительной модификации белков, в частности карбонильных производных, а также снижением мощности системы антиоксидантной защиты, в первую очередь ее ферментативного звена [5, 9, 10]. Аллоксан, применяемый в моделировании сахарного диабета, генерирует токсичные свободные радикалы, повреждающие В-клетки островков Лангерганса [14]. Аллоксан в клетках превращается в диалуровую

кислоту, что сопровождается генерацией супероксид-анион-радикала кислорода, который в реакции с ионами металлов переменной валентности образует гидроксильный радикал [14]. Он способен активировать свободнорадикальное окисление полиненасыщенных жирных кислот в фосфолипидах мембран клеток, вызывать окислительную модификацию белков, в том числе участвующих в трансдукции гормональных сигналов, а также повреждать молекулы ДНК [8]. Активные радикалы и перекисное окисление липидов (ПОЛ) оказывают повреждающее действие не только на В-клетки островков Лангерганса, но и на другие органы и ткани.

Цель исследования — изучение влияния аллоксана на глутатионзависимую систему антиоксидантной защиты и окислительную модификацию белков в адипоцитах эпидидимальной жировой ткани крыс при развитии экспериментального диабета.

Материал и методы

Исследования проведены на адипоцитах, изолированных из эпидидимальной жировой ткани 23 беспородных крыс-самцов массой тела (210 ± 25) г (в опытной и контрольной группах по 8 животных). Животные были получены из ОАО «Питомник „Рассвет“» (г. Томск). Эксперименты проводились согласно Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.) и Федеральному закону «О защите животных от жестокого обращения» от 01.09.1997 г., а также с соблюдением Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, принятой Европейским союзом в 1986 г.

В опытной группе экспериментальный диабет у крыс вызывали четырехкратной инъекцией аллоксана (90 мг/кг массы тела). Через 2 нед после введения аллоксана животных усыпляли CO_2 -асфиксией. Адипоциты из эпидидимальной жировой ткани выделяли по методу M. Rodbell [13] с использованием коллагеназы (Sigma Aldrich, США). Концентрацию адипоцитов в суспензии стандартизировали с помощью разведения буфером до $1 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл. Жизнеспособность выделенных клеток оценивали с трепановым синим (Serva, США).

О развитии ОС в жировых клетках судили по содержанию гидроперекисей липидов, определяемых методом FOX-2 [12], продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты), определяемых методом K. Yagi [16]. Интенсивность

окислительной модификации белков в адипоцитах эпидидимальной жировой ткани оценивали методом, основанным на реакции окисленных остатков аминокислот с 2,4-динитрофенилгидразином [1]. Состояние глутатионзависимой системы антиоксидантной защиты в адипоцитах оценивали по содержанию общего, восстановленного и окисленного глутатиона, определяемого циклическим методом M.E. Anderson [6].

Проверка на соответствие выборок нормальному закону распределения проводилась по критерию Шапиро—Уилки. Выборки не подчинялись нормальному закону распределения на уровне значимости $p < 0,001$, поэтому полученные результаты представлены в таблицах в виде медианы Me , верхнего и нижнего квартилей $Q_1—Q_3$. Достоверность различий выборок оценивали с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни. Различия считались достоверными при достигнутом уровне значимости $p \leq 0,01$.

Результаты и обсуждение

В ходе экспериментальных исследований в эпидидимальной жировой ткани крыс с аллоксановым диабетом зарегистрировано повышение концентрации гидроперекисей липидов в 1,6 раза ($p < 0,01$) (табл. 1). Дегградация первичных метаболитов ПОЛ приводит к накоплению вторичных и конечных продуктов свободнорадикального процесса. Установлено повышение содержания в 5,9 раза ($p < 0,01$) ТБК-активных продуктов в адипоцитах крыс с экспериментальным диабетом (табл. 1). Повышение содержания гидроперекисей липидов и ТБК-активных продуктов может быть следствием окисления ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов в биологических мембранах адипоцитов при действии аллоксана [14].

Таблица 1

Содержание гидроперекисей липидов, ТБК-активных продуктов, общего, восстановленного и окисленного глутатиона в адипоцитах крыс с аллоксановым диабетом ($Me (Q_1—Q_3)$)

Показатель	Контрольная группа	Опытная группа
Гидроперекиси липидов, нмоль/мг белка	5,64 (5,12—5,86)	8,93 (8,87—9,38) $p < 0,01$
ТБК-активные продукты, нмоль/мг белка	0,98 (0,92—1,05)	5,76 (4,70—5,93) $p < 0,01$
GSH + GSSG, нмоль/мг белка	19,61 (19,02—19,86)	15,75 (14,68—15,89) $p < 0,01$
GSH, нмоль/мг белка	17,01 (16,42—17,33)	13,28 (12,10—13,66) $p < 0,01$

GSSG, нмоль/мг белка	2,43 (2,31—2,53)	2,55 (2,54—2,71)
GSH/GSSG	7,30 (6,90—7,60)	5,20 (4,75—5,30)
		$p < 0,01$

Примечание. Здесь и в табл. 2: p — уровень значимости различий, рассчитанный относительно контрольных величин; GSH + GSSG — общий глутатион; GSH — восстановленный глутатион; GSSG — окисленный глутатион.

Таблица 2

Показатели окислительной модификации белков в изолированных адипоцитах крыс с аллоксановым диабетом (Ме (Q_1 — Q_3))

Показатель		Контрольная группа	Опытная группа
Карбонильные производные белков, усл. ед./мг белка	λ , нм		
Спонтанная окислительная модификация белков	274	4,66 (4,41—5,05)	26,18 (23,41—28,82) $p < 0,01$
	363	8,49 (8,24—8,57)	31,85 (30,26—32,13) $p < 0,01$
Металлкатализируемая окислительная модификация белков	274	16,76 (14,10—16,93)	41,82 (41,32—47,28) $p < 0,01$
	363	22,76 (22,41—24,13)	48,33 (47,19—51,24) $p < 0,01$

Окислительный стресс в жировой ткани крыс с аллоксановым диабетом приводил к снижению ($p < 0,01$) концентрации общего глутатиона в 1,2 раза и восстановленной формы трипептида в 1,3 раза. Наметилась тенденция к увеличению содержания окисленного глутатиона (см. табл. 1). При этом значительно снижалась величина отношения восстановленного глутатиона к окисленному, что свидетельствует о сокращении емкости редокс-потенциала глутатионзависимой системы в адипоцитах крыс с аллоксановым диабетом.

Таким образом, развитие экспериментального аллоксанового диабета у крыс приводило к окислительному стрессу. При этом снижается редокс-состояние системы глутатиона в адипоцитах эпидидимальной жировой ткани.

Известно, что продукты ПОЛ вызывают окислительную модификацию белков (ОМБ) [11]. В адипоцитах, изолированных из жировой ткани крыс с аллоксановым диабетом, выявлено повышение ($p < 0,01$) уровня спонтанной ОМБ. При длине волны 274 нм регистрируются альдегидфенилгидразоны — ранние маркеры окислительной деструкции белков, при 363 нм — кетондинитрофенилгидразоны, являющиеся маркерами поздней деструкции белков. Так, при длинах волн 274 и 363 нм в адипоцитах крыс с аллоксановым диабетом установлено увеличение карбонильных производных в 5,6 и 3,8 раза соответственно по сравнению со спонтанным уровнем ОМБ в адипоцитах контрольных животных (табл. 2). Особенно информативным является изучение металлкатализируемых процессов ОМБ, характеризующих окисляемость бел-

ков. Для стимуляции процессов окисления были использованы компоненты системы Фентона. При исследовании металлкатализируемой ОМБ в адипоцитах крыс с аллоксановым диабетом возрастало содержание карбонильных производных в 2,5 и 2,1 раза при длинах волн 274 и 363 нм ($p < 0,01$) соответственно по сравнению с уровнем металлкатализируемой ОМБ в адипоцитах контрольных крыс (табл. 2). Увеличение ОМБ наряду с накоплением продуктов липидной пероксидации считается ранним маркером окислительного повреждения адипоцитов, при котором белки выступают в роли эффективных ловушек генерируемых активных форм кислорода [2, 7].

Известно, что при диабете отмечается увеличение спонтанного и ингибирование стимулированного липолиза [15].

Ранее в исследовании показано, что в адипоцитах активация свободнорадикального окисления прооксидантами также приводит к повышению базального липолиза, который не ингибируется инсулином, и снижению стимулированного адреналином [3, 4]. Это позволяет предполагать, что одним из механизмов изменения липолиза при аллоксановом диабете может являться активация свободнорадикального окисления, приводящая к ОМБ.

Заключение

При аллоксановом диабете развитие окислительного стресса в эпидидимальной жировой ткани крыс приводит к окислительной модификации белков адипоцитов. Можно предположить, что повышенная

окислительная модификация белков является одним из механизмов, приводящих к нарушению трансдукции инсулинового сигнала и возникновению инсулинорезистентности при аллоксановом диабете.

Литература

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбин Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты организма. СПб.: Фолиант, 2000. 103 с.
2. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты. СПб.: Мед. пресса, 2006. 400 с.
3. Иванов В.В., Комов И.В., Фёдорова Т.С. Влияние перекисного окисления липидов на липолиз в жировой ткани // Бюл. сиб. медицины. 2005. Т. 4, прил. 1. С. 59—60.
4. Комов И.В., Иванов В.В., Фёдорова Т.С. и др. Влияние различных концентраций ионов железа на липолиз и перекисное окисление липидов в жировой ткани крыс // Вестн. новых мед. технологий. 2010. Т. XVII, № 3. С. 148—150.
5. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. и др. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА, 2008. 284 с.
6. Anderson M.E. Determination of glutathione and glutathione sulfide in biological samples // Methods Enzymol. 1985. V. 113. P. 548—555.
7. Caraceni P., De Maria N., Ryu H.S. et al. Proteins but not nucleic acids are molecular targets for the free radical attack during reoxygenation of rat hepatocytes // Free Radic. Biol. Med. 1997. V. 23, № 2. P. 339—344.
8. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function // Physiological Reviews. 2002. V. 82, № 1. P. 476—485.
9. Evans J.L., Goldfine I.D., Maddux B.A. et al. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β -cell dysfunction? // Diabetes. 2003. V. 52. P. 1—8.
10. Faure P. Protective effects of antioxidant micronutrients (vitamin E, zinc and selenium) in type 2 diabetes mellitus // Clin. Chem. Lab. Med. 2003. V. 41. P. 995—998.
11. Grimstrud P.A., Picklo M.J., Griffin T.J. et al. Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance // Mol. & Cel. Prot. 2007. V. 6. P. 624—637.
12. Hermes-Lima M., Willmore W.G., Storey K.B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylene orange complex formation // Free Radic. Biol. Med. 1995. V. 19. P. 271—280.
13. Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells // Biol. Chem. 1964. V. 239. P. 375—380.
14. Skudelski T. The mechanism of alloxan end streptozotocin action in B cells of the rat pancreas // Physiol. Res. 2001. V. 50. P. 536—546.
15. Tsujita T. Basal lipolysis in epididymal fat cells from streptozotocin-induced diabetic rats // Nutr. Sci. Vitaminol. 2006. V. 52. P. 47—53.
16. Yagi Y., Matsuda M., Yagi K. Formation of lipoperoxide in isolated sciatic nerve by chinoxaline-ferrous chelate // Experimentia. 1976. V. 32, № 7. P. 905—906.

Поступила в редакцию 19.01.2011 г.

Утверждена к печати 01.04.2011 г.

Сведения об авторах

В.В. Иванов — канд. биол. наук, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии СибГМУ (г. Томск).

Е.В. Шахристова — зав. лабораторией оптической спектроскопии кафедры биохимии и молекулярной биологии СибГМУ (г. Томск).

Е.А. Степовая — д-р мед. наук, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии СибГМУ (г. Томск).

В.В. Новицкий — заслуженный деятель науки РФ, д-р мед. наук, профессор, академик РАМН, зав. кафедрой патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Шахристова Евгения Викторовна, тел. 8-903-913-0293; e-mail: shaxristova@yandex.ru