

## Экспериментальная и профилактическая медицина

УДК 577.1

DOI:10.54503/0514-7484-2022-62.2-54

**Изучение окислительных процессов  
при развитии сахарного диабета у экспериментальных  
животных****Л.М.Овсепян, Г.С.Казарян, А.В.Зангинян, Л.Г. Погосян,  
Ж. И. Акопян***Институт молекулярной биологии НАН РА  
0014, Ереван, ул. Асратяна, 7*

*Ключевые слова:* аллоксановый диабет, SH-группы, основания Шиффа, оксид азота, ПОЛ

Постепенное разрушение  $\beta$ -клеток поджелудочной железы приводит к дефициту инсулина, развитию сахарного диабета (СД), который проявляется тяжелыми нарушениями углеводно-энергетического обмена. Хроническая гипергликемия сопровождается дисбалансом всех функциональных систем организма. Следовательно, необходимо изучать метаболические процессы, которые приводят к постепенному разрушению  $\beta$ -клеток.

Целью исследования было изучение процессов перекисного окисления липидов в общем гомогенате поджелудочной железы и печени аллоксан-индуцированных крыс, количества оксида азота (NO), состояния тиол-сульфидной системы.

Результаты исследования при изучении окислительных процессов в общих гомогенатах поджелудочной железы и печени модельных крыс показали, что наблюдалось накопление продуктов перекисного окисления липидов (гидроксидов, малонового диальдегида, оснований Шиффа). При СД, индуцированном аллоксаном, в поджелудочной железе было обнаружено снижение содержания SH, увеличение содержания окисленных SS-групп тиолов и NO. По результатам нашего исследования можно сделать вывод, что при развитии аллоксанового диабета (АД) наблюдается повышение концентрации активных соединений в поджелудочной железе и печени, что приводит к нарушению нормального функционирования обменных процессов.

**Материал и методы**

Исследование проводили на беспородных белых крысах массой 170-200г, содержащихся в соответствии с правилами Европейской конвенции

по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей (Страсбург, 1986г.).

Аллоксановый диабет вызывали введением 35мг аллоксана. Крыс брали в опыт через 20 дней. Животные были распределены на 2 группы по 15 в каждой: I – интактные; II – животные с воспроизведенным АД.

Уровень глюкозы в капиллярной крови определялся с помощью глюкометра на 10-, 15- и 20-е сутки после введения аллоксана. В опыт брались животные с содержанием сахара больше чем 11-14 ммоль/л.

Об активности ПОЛ судили по количеству образования гидроперекисей (ГПР) и малонового диальдегида (МДА) в общем гомогенате ткани печени и поджелудочной железы контрольных и аллоксандиабетических крыс. ГПР определяли по цветной реакции с тиоцианатом аммония при максимуме поглощения 480 нм [1], МДА – по реакции с тиобарбитуровой кислотой [1], количество белка определяли по Лоури [12].

Основания Шиффа экстрагировали в гептан-изопропанольной фракции, оптическую плотность оснований Шиффа определяли при длине волны 400 нм, выражали в условных единицах [6].

Конечный продукт NO, нитрит, определяли с помощью реактива Грейса (1% сульфаниламида, 0,1 % нафтилендиамина, 2,5 % фосфорной кислоты), абсорбцию раствора измеряли при длине волны 546 нм. В качестве стандарта использовали нитрит натрия [3].

Содержания сульфгидрильных и дисульфидных групп определяли спектрофотометрически при измерении количества тионитрофенильного аниона, образующегося в результате взаимодействия 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной) кислоты (реактив Элмана) со свободными SH-группами белков. Содержание сульфгидрильных и дисульфидных групп выражали в ммоль/г исследуемой ткани [9].

**Статистическая обработка материала.** При оценке полученных результатов проводилась статистическая обработка материала общепринятыми методами вариационной статистики. Для характеристики вариационного ряда были использованы статистические показатели: средняя арифметическая, среднее квадратичное отклонение, ошибка средней арифметической. Математическая обработка данных проводилась компьютерной программой “SigmaPlot 11.0” с использованием специальных руководств по медицинской и биологической статистике.

## Результаты и обсуждение

Как показали результаты исследования, в общем гомогенате поджелудочной железы аллоксандиабетических крыс наблюдается накопление продуктов перекисного окисления липидов (гидроперекисей, малонового диальдегида, оснований Шиффа) (рис.1).

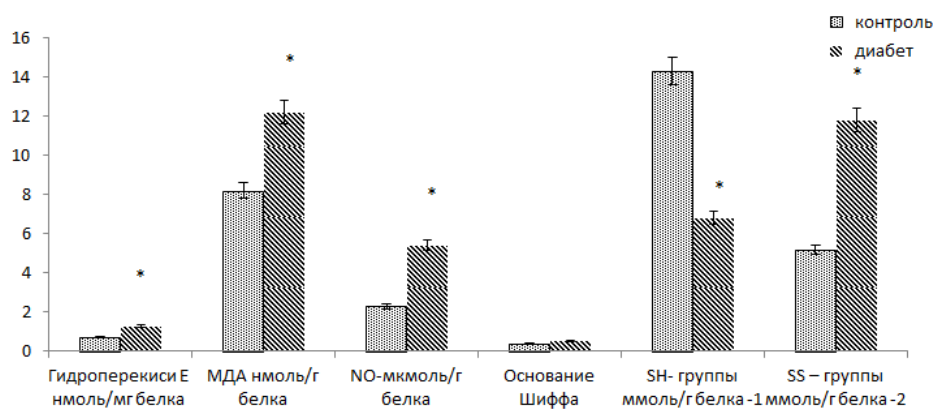


Рис.1. Содержание продуктов перекисного окисления липидов, оксида азота, оснований Шиффа, сульфгидрильных групп в общем гомогенате поджелудочной железы в норме и при аллоксановом диабете (n=15), p < 0,05

Перекисное окисление является цепной реакцией, в ходе которой ГПР преобразуются в альдегидгидроперекиси, которые, в свою очередь, со временем разрушаются с образованием МДА.

Роль поджелудочной железы заключается в обеспечении синтеза гормонов, регулирующих обменные процессы, что связано с выделением панкреатических ферментов, необходимых для нормального функционирования обмена веществ.

Нарушение функции поджелудочной железы приводит к дисбалансу основных физиологических процессов, протекающих в организме. Известно, что  $\beta$ -клетки островков Лангерганса поджелудочной железы очень чувствительны к увеличению содержания свободнорадикальных продуктов. Островковые клетки имеют слабую антиоксидантную защиту и особенно уязвимы для свободных радикалов, что является одной из причин их уменьшения, в результате чего ингибируется синтез инсулина в  $\beta$ -клетках островков поджелудочной железы, что приводит к увеличению содержания сахара в крови [4,5].

Изучение окислительных процессов в гомогенате печени показало также увеличение содержания ГПР, МДА и оснований Шиффа (рис.2).

Малоновый диальдегид способен реагировать с аминок группами аминокислот, белков, а также с тиоловыми группировками аминокислотных остатков белков, изменяя их нативную структуру. При взаимодействии глюкозы с белком образуются основания Шиффа, на первой стадии происходит неферментативная реакция конденсации между  $\alpha$ -амино- или N-концевой группой белка и карбонильной группой восстанавливающего сахара, затем в результате легкообратимой реакции нуклеофильного присоединения достаточно быстро формируется основание Шиффа.

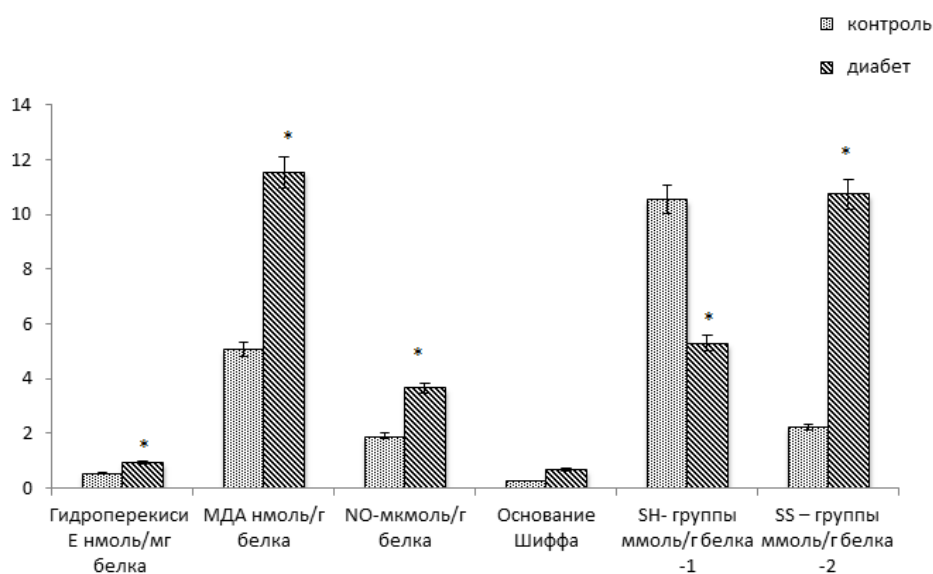


Рис.2. Содержание продуктов перекисного окисления липидов, оксида азота, оснований Шиффа, сульфгидрильных групп в общем гомогенате печени в норме и при аллоксановом диабете (n =15),  $p < 0,05$

При наличии свободных радикалов в среде из основания Шиффа могут образовываться продукты распада, такие как глиоксаль и метилглиоксаль, которые легко реагируют с аминокислотами биополимерами, включая белки и нуклеиновые кислоты, приводя к переходу окислительного стресса в карбонильный [11]. Высокая реакционная активность метилглиоксала обусловлена сильными электрофильными свойствами карбонильной группы, которая при взаимодействии с белками вызывает посттрансляционную модификацию белков[13].

Особый интерес вызывает влияние метилглиоксала на дыхательную цепь переноса электронов, приводя к ингибированию окислительного фосфорилирования. В экспериментах на изолированных гепатоцитах крыс показано, что в концентрации 5 ммоль глиоксаль вызывает падение мембранного потенциала митохондрий, индуцируя формирование митохондриальной дисфункции[14].

Из литературных данных известно, что метилглиоксаль может нарушать инсулиновую сигнализацию клетки, в результате связывания метилглиоксала с субстратами инсулинового рецептора, что приводит к нарушению фосфорилирования инсулинового рецептора и нарушению функционирования сигнального протеинкиназного пути [14]. Дисрегуляция инсулиновой сигнализации оказывает влияние на синтез и секрецию инсулина  $\beta$ -клетки [15]. Действие метилглиоксала на клеточный метаболизм может быть обусловлено образованием конечных продуктов гликирования [8].

Конечные продукты гликирования внутри клеток приводят к нарушению их функции, воспалению, изменяя транскрипцию генов, структуру белков внеклеточного матрикса и циркулирующих белков крови. Хроническая гипергликемия при инсулиновой недостаточности приводит к изменению окислительно-восстановительных реакций в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы, результатом чего является нарушение ее функций.

Нарушению нормального функционирования клеток печени и поджелудочной железы способствует также активирование образования NO. Как показали результаты исследования, в поджелудочной железе и печени аллоксандиабетических крыс наблюдается увеличение содержания NO (рис.1,2). Оксид азота в организме животных и человека синтезируется из L-аргинина с помощью NO-синтаз. Молекулы NO-синтаз содержат домены с оксигеназной и редуктазной активностью и при синтезе NO присоединяют молекулярный кислород к конечному атому азота в гуанидиновой группе L-аргинина. При взаимодействии NO с супероксид-анионом образуются активные соединения нитрозоний ( $\text{NO}^+$ ), нитроксил ( $\text{NO}^-$ ) и пероксинитрит ( $\text{ONOO}$ ). При повышенных концентрациях NO ( $>1\text{ мкМ}$ ) взаимодействует с комплексами дыхательной цепи (цитохромоксидаза, убихинон), приводя к угнетению синтеза аденозинтрифосфата [10]. Благодаря наличию неспаренного электрона, NO проявляет высокую реакционную способность. NO хорошо растворим в воде и липидах и легко проникает через клеточные мембраны. Время жизни оксида азота составляет  $\sim 6\text{--}10$  сек, после чего он превращается в нитраты и нитриты при участии кислорода и воды. Мишенями прямого действия NO являются атомы меди и цинка, входящие в состав ферментов. Важной мишенью для NO в клетке являются белки, содержащие SH-группы. Производное NO, ион нитрозония ( $\text{NO}^+$ ), легко реагирует с SH-группами, образуя биологически активные S-нитрозосоединения. Ион нитрозония повреждает нуклеофильные группы активных тиолов, что приводит к нарушению их функций [2]. По всей видимости, именно оксиду азота, который образуется в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы, принадлежит важная роль в механизмах разрушения и гибели клеток, что и приводит к резкому уменьшению их количества и развитию СД.

Особый интерес представляет изучение содержания сульфгидрильных групп в поджелудочной железе и печени при аллоксановом диабете. Как показали результаты наших исследований (рис.1,2), при аллоксановом диабете в поджелудочной железе и печени обнаружено уменьшение содержания восстановленных SH- и увеличение окисленных SS-групп тиолов. При взаимодействии сульфгидрильных групп с активными формами кислорода происходит окисление тиолов, в результате этих реакций образуются окисленные продукты – сульфоновые кислоты. Увеличение окисленных тиолов приводит к снижению восстановительного потенциала клетки, что приводит к нарушению основных метаболических процессов.

В настоящее время доказано существование взаимосвязи между конформацией белка и редокс-состоянием его SH-групп [16]. Тиоловые группы являются наиболее активными группами белков, способными в физиологических условиях вступать в разнообразные химические реакции (окисления, нитрозилирования, гликирования, алкилирования, тиолирования и др.). Многие из этих реакций обратимы и поэтому имеют исключительное значение для физиологии клетки. Процессы свободнорадикального окисления в организме контролируются антиоксидантной системой, обеспечивающей модификацию свободных радикалов и перекисей. Важную роль в антиоксидантной защите организма играют легкоокисляющиеся пептиды, в состав которых входят SH-содержащие аминокислоты: цистеин, цистин и метионин, которые обладают исключительно высокой реакционной способностью, обеспечивая окислительно-восстановительные реакции в клетке. В ходе окислительно-восстановительных реакций тиоловые группы легко окисляются с образованием, как правило, дисульфидных группировок и вновь регенерируют при их восстановительном расщеплении. Уменьшение содержания восстановленных групп тиолов является оценкой антиоксидантного статуса в клетке [7]. Высокая реакционная способность сульфгидрильных групп белков связана с многообразием химических реакций, в которые они вступают (ацетилирование, фосфорилирование). Сульфгидрильные группы принимают участие в создании сложной трехмерной структуры белков и ферментов, легко образуют различные внутримолекулярные ковалентные водородные связи. Многие ферменты, содержащие SH-группы, такие как АТФазы или дегидрогеназы, легко окисляются в результате свободнорадикальной атаки. В первую очередь воздействию кислородных радикалов подвергаются остатки пролина, гистидина и аргинина, поскольку именно их окисление приводит к снижению содержания восстановленных и повышению уровня окисленных SH-групп. Генерация АФК в дыхательной цепи вызывает повреждение расположенных в непосредственной близости SH-групп тиоловых ферментов и самих мембранных структур, в которых компартиментализована система переноса электронов.

Таким образом, результаты нашего исследования показывают, что развитие аллоксанового диабета сопровождается увеличением концентрации активных соединений в поджелудочной железе и печени, приводящим к нарушению нормального функционирования метаболических процессов.

*Поступила 28.10.21*

**Փորձարարական կենդանիների մոտ շաքարային դիաբետի  
զարգացման դեպքում օքսիդային գործընթացների  
ուսումնասիրություն**

**Լ.Մ. Հովսեփյան, Գ.Ս. Ղազարյան, Հ.Վ. Զանգինյան, Լ.Գ. Պողոսյան,  
Ժ.Բ. Հակոբյան**

Ենթաստամոքսային գեղձի  $\beta$ -բջջերի աստիճանական ոչնչացումը հանգեցնում է ինսուլինի անբավարարության, զարգանում է շաքարային դիաբետը, որն արտահայտվում է ածխաջրերի և էներգետիկ փոխանակության խանգարումներով, քրոնիկ հիպերգլիկեմիայի արդյունքում ուղեկցվում է մարմնի բոլոր ֆունկցիոնալ համակարգերի անհավասարակշռությամբ: Այդ պատճառով կարևոր է հետազոտել նյութափոխանակության այն գործընթացները, որոնք կարող են հանգեցնել  $\beta$ -բջջերի աստիճանական ոչնչացման:

Աշխատանքի նպատակն էր ուսումնասիրել ալոքսանով մակածված առնետների ենթաստամոքսային գեղձի և լյարդի ընդհանուր հոմոգենատում լիպիդների գերօքսիդացման պրոցեսները, ազոտի օքսիդի քանակը, թիոլի դիսուլֆիդային համակարգի վիճակը: Ինչպես ցույց են տվել ուսումնասիրության արդյունքները, մոդելավորված առնետների ենթաստամոքսային գեղձի և լյարդի ընդհանուր հոմոգենատներում օքսիդացման գործընթացներն ուսումնասիրելիս նկատվում է լիպիդների գերօքսիդացման արտադրանքի կուտակում (հիդրօքսիդներ, մալոնային դիալդեհիդ, Շիֆի հիմքեր): Ալոքսանային շաքարախտի ժամանակ ենթաստամոքսային գեղձում և լյարդում հայտնաբերվել են կրճատված SH-ի պարունակության նվազում, թիոլների օքսիդացված SS-խմբերի և NO-ի պարունակության աճ:

Մեր ուսումնասիրության արդյունքների հիման վրա կարելի է եզրակացնել, որ ալոքսանային շաքարախտի զարգացման հետևանքով ենթաստամոքսային գեղձում և լյարդում նկատվում է ակտիվ միացությունների կոնցենտրացիայի ավելացում, ինչը հանգեցնում է նյութափոխանակության պրոցեսների բնականոն գործունեության խաթարման:

## Study of Oxidative Processes with the Development of Diabetes Mellitus in Experimental Animals

L. M. Hovsepyan, G.S. Ghazaryan, H.V. Zanginyan, L.G. Poghosyan,

J. I. Akopian

The gradual destruction of  $\beta$ -cells of the pancreas leads to insulin deficiency, diabetes mellitus develops, which is manifested by severe disorders of carbohydrate-energy metabolism, chronic hyperglycemia is accompanied by an imbalance of all functional systems of the body. Therefore, it is possible to study metabolic processes that can lead to the gradual destruction of  $\beta$ -cells.

The aim of this study was to investigate the processes of lipid peroxidation in the total homogenate of the pancreas and liver of alloxan-induced rats, the amount of nitric oxide, and the state of the thiolisulfide system.

As it is stated by the results of the study, the oxidative processes in the total homogenates of the pancreas and liver of model rats showed accumulation of lipid peroxidation products (hydroxides, malondialdehyde, Schiff bases).

In alloxan-induced diabetes mellitus, a decrease in the SH content, an increase in the content of oxidized SS-groups of thiols and NO were found in the pancreas. According to the results of our research, it can be concluded that with the development of alloxan diabetes, an increase in the concentration of active compounds in the pancreas and liver is observed, which leads to disruption of the normal functioning of metabolic processes.

## Литература

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. СПб., 2000.
2. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы – две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах. Биохимия, 1998, 63, (7), с.924–38.
3. Голиков П.П., Николаева Н.Ю., Гавриленко И.А. Оксид азота и перекисное окисление липидов, как факторы эндогенной интоксикации при неотложных состояниях. Бюл. exper. биол. и мед. 2000, (7), с. 6 – 9.
4. Дедов И.И., Шестакова М.В. Сахарный диабет: диагностика, лечение, профилактика. М., 2011.
5. Дедов И.И., Балаболкин М.И. Патогенез сахарного диабета. Мед. акад. журн., 2006, (6), 3, с.3.
6. Львовская Е.И., Волчегорский И.А., Шемяков С.Е., Лифшиц Р.И. Спектрофотометрическое определение конечных продуктов ПОЛ. Вопросы мед.химии, 1991, (4), с.92-93.
7. Соколовский В.В. Тиол-дисульфидное соотношение крови как показатель состояния неспецифической резистентности организма. СПб., 1996.



8. *Ahmed N., Thornalley P. J.* Роль конечных продуктов гликирования в патогенезе осложнений сахарного диабета. РМЖ, 2009, (9).
9. *Barkovsky YeV. et al.* by ed. Chirkin AA. Modern problems of biochemistry, research methods, studies, manual for graduate students of higher education on biol. and honey. Specialties. Minsk, Higher School, 2013, p. 491.
10. *Brown GS., Borutatte V.* Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med.*, 2002, 33:11:1440-1450.
11. *Davydov VV., Dobaeva NM., Bozhkov AI.* Possible role of aldehydes scavenger enzymes during aging. *Exp. Gerontol.*, 2004, 39:11-16.
12. *Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL.* Protein Measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, 1951, 193: 265-275.
13. *Matafome P., Rodrigues T., Sena C., and Seica R.* Methylglyoxal in metabolic disorders: facts, myths, and promises, *Med. Res. Rev.*, 2017, 37:368–403.
14. *Pamela Boon Li Pun, Michael P. Murphy.* Pathological Significance of Mitochondrial Glycation. *International Journal of Cell Biology*, 2012, 1-13. DOI: 10.1155/2012/843505.
15. *Riboulet-Chavey A., Pierron A., Durand I., Murdaca J., Giudicelli J., Van Obberghen E.* Methylglyoxal impairs the insulin signaling pathways independently of the formation of intracellular reactive oxygen species. 2006, *Diabetes* 55:1289–1299.
16. *Trachootham D., Lu W., Ogasawara M. A., Nilsa R. D., Huang P.* Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal.* 2008 Aug, 10(8): 1343–74. Doi: 10.1089/ars.2007.1957.