

РЕГУЛИРОВАНИЕ ДЕЛЬТА-СОНИНДУЦИРУЮЩИМ ПЕПТИДОМ ЭНДОГЕННЫХ УРОВНЕЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНОВ И ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ КРЫС ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ

А.Р. Варданян, Д.М. Геворкян, М.И. Агаджанов, М.А. Симонян

*/Ереванский государственный медицинский университет им. М. Гераци, Гомрийский
мед.колледж, Институт биохимии им. Г. Х.Бунятыана НАН РА /
375025 Ереван, ул. Корюна, 2*

Ключевые слова: аллоксановый диабет, металлопротеины крови, дельта-сониндуцирующий пептид, окислительный стресс

При аллоксановом диабете (АД) в крови крыс наблюдается нарушение содержания эндогенных металлопротеинов (антиоксидантных и прооксидантных) — регуляторов метаболизма активных форм кислорода (АФК), что является одним из механизмов возникновения окислительного стресса, развивающегося на фоне высокого уровня АФК, в первую очередь супероксидных радикалов ($O_2^{\cdot-}$) [4]. Известно, что дельта-сониндуцирующий пептид (ДСИП) обладает антистрессорным эффектом [7]. Целью данной работы является изучение при АД влияния ДСИП на уровень окислительного стресса.

Материал и методы

АД вызывали однократным внутрибрюшинным введением беспородным крысам аллоксана ("Sigma", США) в дозе 140 мг/кг. Опыты проводили на 30 опытных и 10 контрольных крысах массой 150–180 г. Опытные крысы были разделены на три группы (по 10 в каждой). В первую опытную группу (ОГ-1) вошли животные, которым внутрибрюшинно вводили аллоксан в указанной дозе. В ОГ-2 и ОГ-3 вошли животные, получившие внутрибрюшинно ДСИП (по 12 мкг/100 г) за час до введения аллоксана и спустя трое суток соответственно. Контрольные животные вместо аллоксана получали физиологический раствор в аналогичном режиме. В указанных группах гибели животных не наблюдалось. На 7-е сутки крыс декапитировали под легким эфирным наркозом, кровь забирали на натрийоксаладном буфере.

Из крови выделяли и очищали металлопротеины антиоксидантного (Cu, Zn-супероксиддисмутаза — СОД и каталаза — из растворимой фракции эритроцитов, церулоплазмин — ЦП и трансферрин — ТФ — из сыворотки крови) и прооксидантного действия (цитохромы: В-5 — из растворимой фракции эритроцитов, В-558 I и В-558 II — из сыворотки, В-558 III и В-558 IV — из мембран эритроцитов и супрол — супероксидпродуцирующий липопротеин — из сыворотки крови) путем ионообменной хроматографии отделированных против воды белковых фракций сыворотки, мембран эритроцитов (после их солубилизации) и растворимой фракции эритроцитов на целлюлозах КМ-52, ДЕ-52 ("Whatman", Англия), сефадексе ДЕАЕ А-50 и СМ-С-50 ("Pharmacia", Швеция). Гель-фильтрацию белковых фракций проводили на биогелях Р-100 и Р-150 ("Reanal", Венгрия) [8].

СОД-активность фракций и $O_2^{\cdot-}$ -продуцирующую активность супрола определяли с помощью нитротетразолия синего (НТС) [17] путем определения процента ингибирования или прироста (в случае супрола) образования формазана (при 560 нм) при восстановлении супероксидом НТС в присутствии СОД или супрола, соответственно в расчете на 1 мл эритроцитов (для СОД) и сыворотки (для супрола) [9]. Каталазную активность фракций и ферроксидазную активность ЦП определяли спектрографическим методом из расчета на 1 мл эритроцитов [20]. Содержание металлопротеинов определяли на основании максимальных величин оптических плотностей: для ЦП при 610, ТФ — 490, супрола — 430, цитохрома В-5—525, цитохромов В-558 I—IV — 530 нм [8]. Количество глюкозы в плазме определяли методом Spiro [23]. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

Нами было показано, что при семидневном АД окислительный стресс сопровождается характерным изменением уровней продуцирующих и утилизирующих АФК металлопротеинов в крови (таблица). При этом наряду с повышением уровня прооксидантных металлопротеинов (цитохромы В-558 III, В-558 IV, В-5 и супрол) крови, ответственных за продуцирование $O_2^{\cdot-}$ и их производных (H_2O_2 , $HO^{\cdot}$, $ROO^{\cdot}$, $HO^{\cdot}$, $HO^{\cdot}$ и др.) [19], наблюдается снижение уровня сывороточных антиоксидантов – цитохромов В-558 I, В-558 II и СОД. При этом наблюдается потеря $O_2^{\cdot-}$ – продуцирующей активности супрола и ферроксидазной активности ЦП, что приводит к образованию ионов Fe^{+2} , которые способны продуцировать $O_2^{\cdot-}$ в реакции Габера-Вейса [14]. Другим источником $O_2^{\cdot-}$ при диабете является сама глюкоза, которая способна повышать выход $O_2^{\cdot-}$ при расщеплении перекиси водорода и липоперексидов [11, 15] в результате нарушения функции β -клеток, а также путем повышения гликозилирования белков [1, 18]. При АД ЦП и ТФ претерпевают не только количественные, но и качественные изменения [13]. Понижение уровня СОД, возможно, связано с повышенным ее расходом в процессе дисмутации больших количеств $O_2^{\cdot-}$, и в этом каталитическом цикле генерируется H_2O_2 .

Таблица

Влияние профилактического (за 1 час) и лечебного (спустя 3 суток) введения ДСИП на содержание металлопротеинов в крови крыс при семидневном аллоксановом диабете (контрольные показатели приняты за 100%, $p < 0.05$, $n=4$)

Металлопротеины	ОГ-1	ОГ-2	ОГ-3
Цитохром В-5	+65.2±2.2	+22.5±1.4	+41.3±1.4
Сумма цитохромов В-558 I и II	-21.2±1.1	-11.3±1.2	-16.1±0.9
Цитохром В-558 III	+52.3±2.4	+8.4±0.8	+40.2±2.1
Цитохром В-558 IV	+67.2±3.2	21.3±1.7	+53.4±3.1
Супрол	55.6±2.9	+12.4±1.3	+50.1±2.8
$O_2^{\cdot-}$ – продуцирующая активность супрола	-23.2±1.2	-12.4±1.4	-18.1±1.3
Окислительная активность ЦП	-15.8±1.9	-9.2±0.5	-12.3±0.8
ЦП	+52.4±2.5	+16.2±1.2	+31.3±1.8
ТФ	+48.1±2.3	+12.3±0.9	+28.5±1.6
СОД	-25.1±1.3	+10.4±1.2	-17.5±0.7
Каталаза	+20.3±1.2	+11.1±0.7	+18.7±1.4

В то же время $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 способны инактивировать СОД [22], каталазу [21], ЦП [11] и супрол [9]. Повышение уровня перекиси водорода при АД в крови может увеличить расход сывороточных антиоксидантных цитохромов В-558 I и В-558II [9]. В ОГ-2 и ОГ-3 (таблица) направленность изменений сохраняется, однако их диапазон отличается в зависимости от срока введения ДСИП. В ОГ-2 при профилактическом введении адаптогена ДСИП за 1 час наблюдается острая тенденция к нормализации изученных показателей. Механизм действия ДСИП практически пока не определен, тем не менее существует мнение, что профилактическое введение ДСИП intactным крысам способствует повышению резистентности организма благодаря развитию состояния “преадаптации” в результате пролонгирования влияния ДСИП на суточную динамику концентраций катехоламинов и серотонина в коре и подкорковых структурах, а также фазных изменений в равновесии про- и антиоксидантных систем мозга и крови, в результате чего наблюдается выраженный мембраностабилизирующий эффект пептида в отношении не только нейрональных, но и эритроцитных мембран [2, 6, 7].

Анализируя полученный материал, можно прийти к заключению, что обнаруженные при АД сдвиги в содержании металлопротеинов подтверждают наличие окислительного стресса. Антиоксидантная система не в состоянии компенсировать усиление липидной перекисидации [5], понижается активность основных ферментов антирадикальной защиты, в том числе основного сквенджера активного кислорода – СОД [5].

Введение ДСИП при АД оказывает выраженное адаптогенное действие, подобно действию α -токоферола [5], которое обусловлено снятием мембранотоксического и мембранолитического влияния продуктов свободнорадикального окисления липидов. Наиболее эффективным оказалось профилактическое введение ДСИП (группа ОГ-2), которое выражается как в нормализации уровня глюкозы (45.7 ± 13.5 мг% против 190.8 ± 14.2 в группе ОГ-1), так и приближении к контрольному уровню исследованных металлопротеинов (таблица). Нельзя исключить и лечебный эффект ДСИП, при котором уровень глюкозы в крови понижается по сравнению с АД на 47%, наблюдается тенденция к нормализации металлопротеинов (ОГ-3). Можно предположить, что ДСИП, не являясь истинным антиоксидантом, оказывает модулирующее влияние на активность антиоксидантной системы [3].

Поступила 31.03.00

ԱՐՅԱՆ ԷՆԴՈԳԵՆ ՄԵՏԱՎԱՊՐՈՏԵԻՆՆԵՐԻ ԵՎ ԳԼՅՈՒԿՈԶԻ ԿԱՐԳԱՎՈՐՈՒՄԸ ԴԵԼՏԱ-ՆԻՆԶ ԻՆԴՈՒՑՈՂ ԳԵՏԻՎՈՐԱՎ ԱԼՈՔՍԱՆԱՅԻՆ ՇԱՔԱՐԱՄԱՏՈՎ ԱՌԵՏՆԵՐԻ ՄՈՏ

Ա.Ռ. Վարդանյան, Դ.Մ. Գևորգյան, Մ.Ի. Աղաճանյան, Մ.Ա. Սիմոնյան

Դիտա-նինջ ինդուցող պեպտիդի (ԴՆԻՊ) կամխաբզնիչ ներմուծումը կարգավորելով գլյուկոզի մակարդակը արյան մեջ, միաժամանակ առաջացնում է պրոօքսիդանտային մետաղապրոտեինների ցիտոքրոմներ B-5, B-558 I, II, III, IV և սուպրոլի մակարդակի նվազում պարզամային շաքարախտով առնետների արյան մեջ: Դրան զուգընթաց տեղի է ունենում հակաօքսիդանտային մետաղապրոտեինների կառավարի, Cu, Zn-սուպրօքսիդիդիմուտագի, տրանսֆերինի, ցերուլոպլազմինի և ցերուլոպլազմինի օքսիդանտային ակտիվության կարգավորում:

DELTA-SLEEP INDUCING PEPTIDE REGULATION EFFECT ON THE LEVELS OF ENDOGEN METALLOPROTEINS AND GLUCOSE IN RAT BLOOD DURING ALLOXANIC DIABETES

A.R. Vardanyan, D.M. Gevorgyan, M.I. Aghadjanov, M.A. Simonyan

Administration of delta-sleep inducing peptide (DSIP) to rats with alloxanic diabetes decreases in the blood the level of prooxidant metalloproteins cytochromes B-5, B-558 I, II, III, IV, and suprol. At the same time it is demonstrated the elevating effect of DSIP on the level of antioxidant metalloproteins catalase, Cu, Zn-superoxide dismutase, transferrine, ceruloplasmine and its oxidative activity.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанов М.И., Геворкян Д.М., Межлумян Л.М. Тр. 68-й отч. научн. сес. ЕрМИ, 1989, Ереван, с. 9.
2. Альперович Д.В., Лысенков А.В., Михалева И.И. и др. Нейрохимия, 1999, 16, с. 29.
3. Бобырев В.Н., Почеряева В.Ф., Стародубцев С.Г. Экспер. и клинич. фармакология. 1994, 57, 1, с. 47.
4. Ваданян А.Р., Геворкян Д.М., Агаджанов М.И., Симонян М.А. Мед. наука Армении, 1999, 39, 2, с. 38.
5. Геворкян Д.М. Бюлл. экспер. биол. и мед., 1989, 3, с. 298.
6. Лысенко А.В., Альперович Д.В., Ускова Н.И. и др. Нейрохимия, 1999, 16, с. 37.
7. Менджерский А.М., Лысенко А.В., Ускова Н.И. и др. Нейрохимия, 1996, 13, с. 23.
8. Симонян М.А., Симонян Г.М., Мелконян Р.В. Способ получения металлопротеинов. Лицензия изобр. N 341. Патент. управ. РА, Ереван, 1997.
9. Симонян М.А., Карапетян А.В., Бабалян М.А., Симонян Р.М. Биохимия, 1996, 61, с. 932.
10. Симонян Г.М., Григорян Г.Г., Симонян М.А., Симонян Р.М. В кн.: Актуальные вопросы медицины, (военно-медицинский факультет ЕРГМУ). Ереван, 1999, с. 48.
11. Симонян М.А. Автореф. докт. дис. Ереван, 1996.
12. Abei H. Methods in Enzymol., 1984, 105, p. 121.
13. Aladzhov E. Exp. Med. Morphol., 1987, 26, p. 39.
14. Gutteridge J.M.C. FEBS Lett., 1982, 150, p. 454.
15. Fujimoto S., Kawakami N., Ohara A. Biol. Pharm. Bull., 1995, 18, p. 396.
16. Kashem A., Nomoto Y., Tanabe R. Perit. Dial. Int., 1998, 18, p. 52.
17. Nishikimi M., Rao N.A., Jagi K. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1972, 64, p. 949.
18. Ortwerth B.J., James H., Simpson G. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1998, 245, p. 161.
19. Simonyan M.A. World Congress "Oxidants and Antioxidants in Biology". 1999, California, Santa Barbara.
20. Reilly C.A., Aust S.D. Arch. Biochem. Biophys., 1997, 347, p. 242.
21. Shimizu N., Kobayashi K. J. Biol. Chem., 1984, 259, p. 4414.
22. Smet P.M., Garber P. Arch. Biochem. Biophys., 1981, 212, p. 411.
23. Spiro R.G. Methods in Enzymol., 1966, 8, p. 3.