

**УДК 577.112.4:598/599**

## **ИЗМЕНЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРИНСУЛИНЕМИИ**

*Никольская В.А.*

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина  
E-mail: nikolskaja@crimea.edu*

При экспериментальной гиперинсулинемии наблюдаются реципрокные изменения содержания молекул средней массы в гемолизате эритроцитов крови лабораторных крыс и повышение активности каталазы. Методом определения окислительной модификации белков установлена активация перекисных процессов в эритроцитах крови с образованием альдегидных и кетонных продуктов нейтрального и основного характера.

**Ключевые слова:** гиперинсулинемия, эритроциты крови, окислительная модификация, молекулы средней массы.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Одним из фундаментально-прикладных перспективных направлений биохимии является исследование состояний, сопровождающихся гиперинсулинемическим синдромом [1-7]. Данное состояние отмечено помимо инсулиннезависимого сахарного диабета при целом ряде заболеваний сердечно-сосудистой системы [7-18]. Вместе с тем хорошо известен феномен гиперинсулинемии как адаптивный процесс, который развивается в ответ на тканевую гипоксию после достаточно длительного периода гипоксических тренировок [1].

Известно, что в систему транспорта инсулина включаются эритроциты крови [19]. Несмотря на то, что эритроциты не относятся к классическим чувствительным к инсулину структурам, показано их участие в обеспечении инсулиндепонирующей функции за счет участия специфических и гидрофобных взаимодействий. Однако их состояние при гиперинсулинемии не исследовано. Изучение на молекулярно-клеточном уровне процессов развития гиперинсулинемического синдрома способствует формированию знаний о механизмах биорегуляции, определяющих состояние организма.

В связи с этим, целью работы явилось изучение отдельных биохимических показателей эритроцитов крови лабораторных крыс, подвергшихся воздействию экспериментальной гиперинсулинемии.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Материалом для исследований служил гемолизат эритроцитов крови лабораторных крыс у которых вызывали инсулиновый шок. Гемолизат эритроцитов

получали по методу Драбкина [20]. Определение уровня глюкозы в гемолизате эритроцитов проводили ферментативным методом [21-25]. Опыты выполнены на 100 лабораторных белых крысах-самцах (*Rattus norvegicus*) массой 180 – 200 г. Все животные содержались в обычных условиях вивария на стандартном пищевом рационе и были разделены на следующие группы: интактная; группа, у которой выражена гиперинсулинемия; группа, у которой состояние гиперинсулинемии купировалось глюкозой. Лабораторным крысам опытных групп натошак подкожно вводили по 3,5 Ед инсулина. После появления судорог, развития гипогликемической комы, часть животных декапитировали. Остальным крысам для купирования комы вводили внутривенно по 3,5 мл 20% раствора глюкозы. Контрольные животные получали в таком же объеме физиологический раствор. После исчезновения признаков гиперинсулинемии животных декапитировали.

Для определения окислительной модификации белков гемолизата эритроцитов крови использовали метод Е.Е. Дубининой [26]. Оптическую плотность образовавшихся динитрофенилгидразонов регистрировали при длинах волн: 346 и 370 нм (альдегидные и кетонные продукты окислительной модификации нейтрального характера), а также при 430 нм и 530 нм (альдегидные и кетонные продукты окислительной модификации основного характера). Содержание молекул средней массы в гемолизате эритроцитов определяли по методу Н.И. Габриэлян и др. [27, 28].

Оценка достоверности различий между данными, полученными в результате исследования, проводилась с использованием t-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В ходе исследований для подтверждения наличия гипогликемической комы и её купирования проводилось определение концентрации глюкозы в гемолизате эритроцитов интактной группы и групп крыс в состоянии гиперинсулинемии (рис. 1).

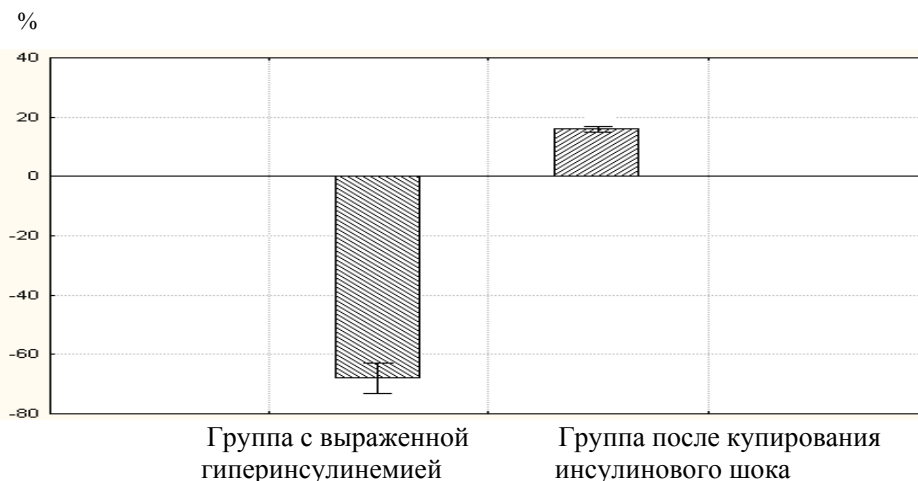


Рис. 1. Изменения концентрации глюкозы в гемолизате эритроцитов лабораторных крыс экспериментальных групп относительно показателя интактной группы, ( $\bar{x} \pm S\bar{x}$ ).

Результаты проведенного определения свидетельствуют о том, что содержание глюкозы в гемолизате эритроцитов группы с выраженной гиперинсулиемией уменьшается в 3 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с интактной группой. Это свидетельствует о наличии состояния инсулинового шока. Повышение данного показателя у группы лабораторных животных после купирования комы по сравнению с группой в состоянии инсулинового шока в 3,5 раза ( $p < 0,05$ ) доказывает устранение действия гиперинсулиемии.

Однако следует отметить дальнейшую тенденцию к повышению концентрации глюкозы в эритроцитах крови группы лабораторных животных, введенных в инсулиновый шок с последующим его купированием, по сравнению с интактной группой, что возможно связано с искусственной коррекцией её уровня, приведшей к компенсаторной перестройке метаболизма глюкозы в эритроцитах организма, подвергшегося действию избыточных доз инсулина.

Одним из направлений данного исследования явилось изучение содержания молекул средней массы (МСМ) в гемолизате эритроцитов лабораторных крыс в условиях гиперинсулиемии и после выведения животных из состояния инсулинового шока.

Результаты исследования (рис. 2) свидетельствуют о реципрокных изменениях содержания МСМ в гемолизате эритроцитов крови лабораторных крыс, подвергшихся воздействию инсулинового шока: повышению – для  $\lambda$  регистрации 254 ( $p < 0,05$ ) и снижению – при  $\lambda$  регистрации 272 и 280 нм ( $p < 0,05$ ).

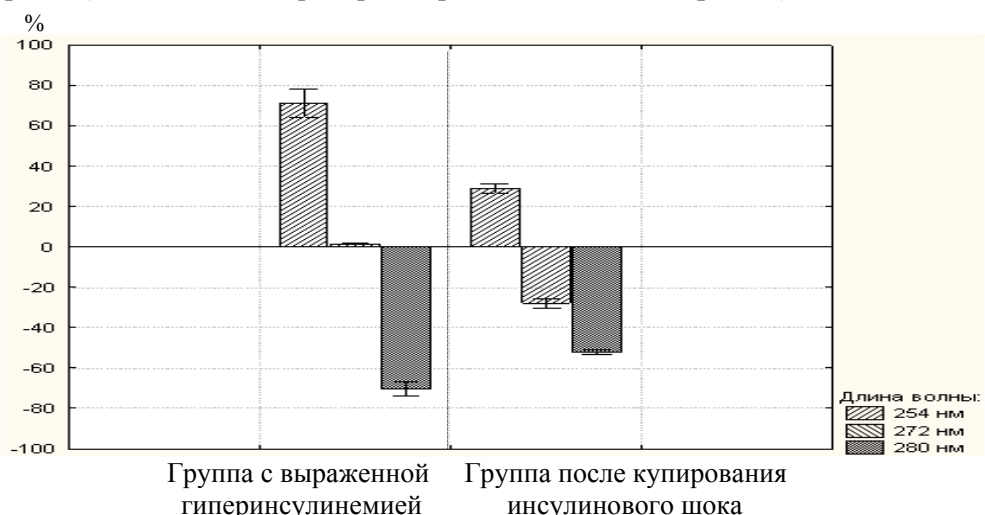


Рис. 2. Изменения содержания молекул средней массы в гемолизате эритроцитов крови лабораторных крыс экспериментальных групп относительно показателя интактной группы, ( $\bar{x} \pm S\bar{x}$ ).

Снижение молекул средней массы при  $\lambda=280$  нм может быть обусловлено уменьшением свободного триптофана и триптофансодержащих среднемолекулярных олигопептидов. При окислении олигопептидов и белков гидроксильным радикалом и синглетным кислородом происходит фрагментация белков. Одновременно происходит

разрушение триптофана. Триптофан и тирозин подвергаются окислительным превращениям, которые сопровождаются модификацией аминокислотных остатков, образованием внутри- или межмолекулярных сшивок между полипептидными цепями, снижением уровня триптофана и значительной продукцией битирозинфенола [26-28]. Кроме того, не исключена возможность участия молекул средней массы  $\lambda=280$  нм в посттрансляционной модификации белкового каркаса эритроцитарной мембраны [29], что также будет отражаться на уровне их регистрации.

Повышение данного показателя для  $\lambda$  регистрации 254 в гемолизате эритроцитов крови экспериментальных групп лабораторных крыс может быть связано с поступлением олигопептидов из сыворотки крови, и в данном случае может служить аргументом в подтверждение теории зарубежных авторов, указывающей на наличие специализированного канала для пептидов в эритроцитарных мембранах [30].

Возможно, уровень молекул средней массы в эритроцитах крови отражает их вклад в механизмы компенсаторной стабилизации данных структурных компонентов крови. Можно также предположить, что именно повышение/снижение определенного вида данных регистрируемых соединений имеет существенное значение в регуляции внутриэритроцитарных процессов метаболизма, поскольку в литературе имеются данные, свидетельствующие о широком спектре биологической активности фракций молекул средней массы, в том числе антиоксидантной [31-32]. Однако этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Поскольку инсулиновый шок является состоянием, активизирующим процессы образования активных форм кислорода [33-36], вполне обоснованным явилось определение уровня окислительной модификации белков в гемолизате эритроцитов крови лабораторных крыс (рис.3).

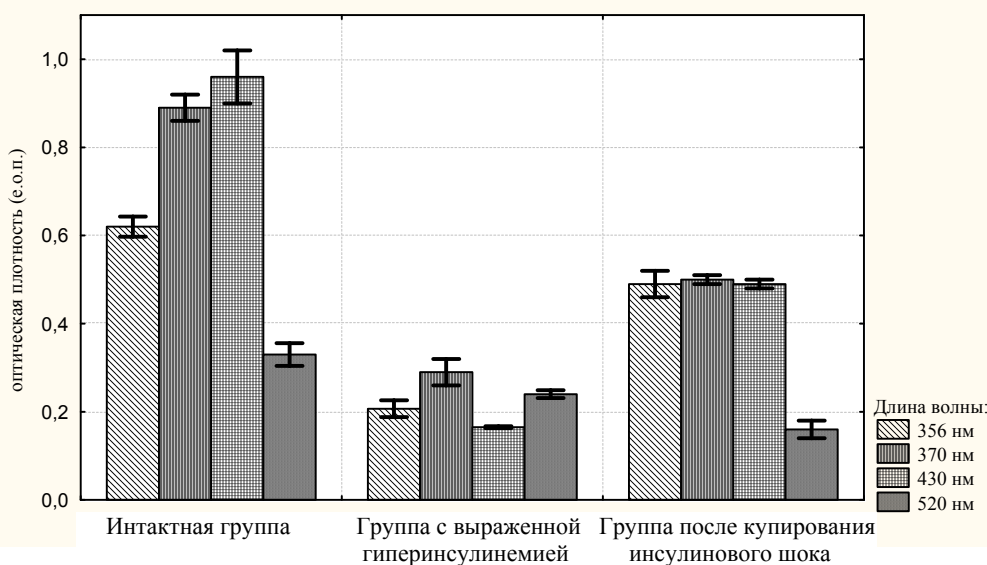


Рис. 3. Изменение содержания продуктов окислительной модификации белков в гемолизате эритроцитов крови лабораторных крыс при воздействии экспериментальной гиперинсулинемии, ( $\bar{x} \pm S\bar{x}$ ).

Как следует из данных, представленных на рисунке 3, содержание продуктов окислительной модификации в эритроцитах крови лабораторных крыс экспериментальной группы с выраженной гиперинсулинемией ниже уровня данного показателя интактной группы в 1,3-6 раз ( $p < 0,05$ ).

В литературе накоплено достаточное количество материала об увеличении количества активных форм кислорода (АФК), выступающих в роли вторичных посредников, при воздействии различных факторов, в том числе и инсулина [32-34, 37-41]. В пользу этого свидетельствует аккумуляция АФК, модификация эффектов этого гормона под влиянием АФК и их снижение или блокада антиоксидантами [37]. Вероятно, полученные результаты связаны с тем, что при воздействии избыточных доз инсулина происходит усиление модификации белков, которые окисляются АФК до образования кислот с последующим снижением регистрируемого показателя.

Обращает внимание тот факт (рис.3), что после купирования инсулинового шока достоверно повышается уровень альдегидных продуктов (нейтрального и основного характера, длины регистрации  $\lambda = 356$  в 2,3 раза и  $\lambda = 430$  нм в 3 раза, соответственно, ( $p < 0,05$ )) окислительной модификации белков по сравнению с группой в состоянии выраженной гиперинсулинемии.

Из литературных данных известно, что глюкоза проявляет свойства альдегида [42-43]. В результате взаимодействия с белками и последующих химических перегруппировок образуются ендиолы, которые при взаимодействии с металлами переменной валентности, в физиологических условиях представленными главным образом железом, преобразуются в ендиольные анион-радикалы, трансформирующиеся глюкозоны, восстанавливая при этом кислород до супероксида [42]. То есть, глюкоза может проявлять окислительные свойства, а, так как экспериментальная группа крыс подверглись искусственному купированию избыточности инсулина глюкозой, и уровень последней проявляет тенденцию к увеличению, то, возможно, с этим и связано увеличение альдегидных и кетонных продуктов окислительной модификации белков в гемолизате крови.

Биологическая роль каталазы заключается в деградации перекиси водорода и обеспечении эффективной защиты клеточных структур от разрушения под действием перекиси водорода. В связи с этим одним из направлений данного исследования явилось изучение изменения активности каталазы в эритроцитах лабораторных животных, подвергшихся воздействию инсулинового шока.

Представленные данные (рис. 4) свидетельствуют об увеличении активности каталазы в эритроцитах крови лабораторных крыс экспериментальных групп по сравнению с интактной группой практически в 2 раза ( $p < 0,05$ ), что может отражать высокую степень активизации антиоксидантной защиты, динамику адаптационных и антиокислительных механизмов, опосредованных антиоксидантной системой, которая активно тормозит спонтанную цепную пероксидацию. Возможно, происходит накопление перекисных соединений – предполагаемых вторичных посредников сигнальной системы передачи действия инсулина, что и приводит к увеличению активности каталазы.

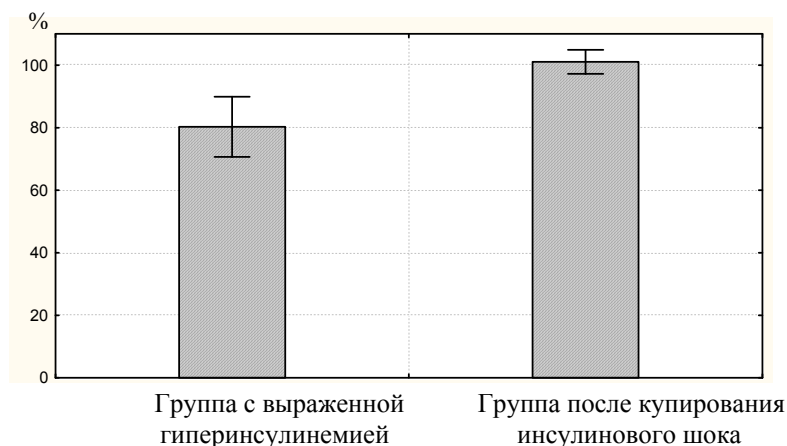


Рис. 4. Изменение активности каталазы в гемолизате эритроцитов лабораторных крыс экспериментальных групп относительно интактной группы, ( $\bar{x} \pm S\bar{x}$ )

Таким образом, полученные результаты исследования свидетельствуют о значительных компенсаторных возможностях эритроцитов крови лабораторных животных, подвергшихся экспериментальной гиперинсулинемии, как клеток, реализуемых на уровне антиоксидантной системы, одним из звеньев которой могут являться молекулы средней массы.

#### ВЫВОДЫ

1. Воздействие инсулинового шока приводит к уменьшению концентрации глюкозы в эритроцитах крови лабораторных крыс, подвергшихся экспериментальной гиперинсулинемии, в 3 раза по сравнению с интактной группой. У лабораторных животных, выведенных из состояния инсулинового шока, данный показатель увеличивается в 3,5 раза по сравнению с группой без купирования и проявляет дальнейшую тенденцию к повышению по сравнению с интактной группой.
2. В состоянии экспериментальной гиперинсулинемии в эритроцитах крови лабораторных животных наблюдается снижение содержания молекул средней массы при  $\lambda$  регистрации 272 и 280 нм в 2,3 раза и повышение – в 1,5 раза при  $\lambda=254$  нм по сравнению с интактной группой.
3. Экспериментальная гиперинсулинемия снижает содержание продуктов окислительной модификации белков в эритроцитах крови лабораторных крыс в 1,3-6 раз по сравнению с интактной группой. После купирования инсулинового шока наблюдается повышение данного показателя у лабораторных животных по сравнению с группой без устранения гиперинсулинемии.
4. Под влиянием гиперинсулинемии выявлено увеличение активности каталазы в гемолизате эритроцитов крови лабораторных крыс группы в состоянии выраженной гиперинсулинемии по сравнению с интактной группой. Данный

показатель проявляет тенденцию к увеличению в эритроцитах крови группы лабораторных крыс после купирования инсулинового шока глюкозой.

Список литературы

1. Ogilvy-Suart A. Hypoglycemia, management of hyperinsulinism / A. Ogilvy-Suart, P. Midgley // *Practical Neonatal Endocrinology*. – 2006. – P. 7–27.
2. Архипов В.Ф. Особенности раннего послеоперационного периода у больных органическим гиперинсулинизмом / В.Ф. Архипов // *Вестник хирургии*. – 1996. – Том 155, №2. – С. 29–32.
3. Асмоловская М.Б. Пато- и морфогенетические особенности диабетических ангиопатий / М.Б. Асмоловская, А.Е. Доросевич // *Здравоохранение Белоруссии*. – 1992. – №7. – С. 53–59.
4. Диагностика и лечение органического гиперинсулинизма / А.В. Егоров, Н.М. Кузин, С.А. Кондрашин [и др.] // *Хирургия*. – 1999. – №12. – С. 21–26.
5. Инсулинотерапия больных сахарным диабетом / [Ефимов А.С., Скробонская Н.А., Ткач С.Н., Сакало Е.А.]. – К.: Здоровье, 2000. – 248 с.
6. Гиперинсулинемия и инсулинрезистентность у женщин с метаболическим синдромом в климактерическом периоде / Н.В. Изможерова, А.А. Попов, Н.В. Тагильцева [и др.] // *Клиническая медицина*. – 2006. – №5. – С. 65–68.
7. Органический гиперинсулинизм / Н.М. Кузин, А.В. Егоров, М.Г. Лакреева [и др.] // *Клиническая медицина*. – 1998. – №4. – С. 7–11.
8. High blood glucose concentration is a risk factor for mortality in middle-aged nondiabetic me/ B. Balkou, M. Shipley, Jarrett R.J. [et al.] // *Diabetes Care*. – 1998. – V. 21. – P. 360–367.
9. Barrett Connor E.M. Does hyperglycemia really cause coronary heart disease? / E.M. Barrett Connor // *Diabetes Care*. – 1997. – V. 20. – P. 1620–1623.
10. Mortality from coronary heart disease in the Tecumseh Study. Long-term effect of diabetes mellitus, glucose tolerance and other risk factors / W.J. Butler, L.D. Ostrander, W.J. Carman [et al.] // *Am. J. Epidemiol.* – 1985. – V. 121. – P. 541–547.
11. Diabetes and cardiovascular disease. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association / S.M. Grundy, I.J. Benjamin, G.L. Burke [et al.] // *Circulation*. – 1999. – V. 100. – P. 1134–1146.
12. Loren Cordain. Hyperinsulinemic diseases of civilization: more than just syndrome X / Cordain Loren, R. Michael Eades, D. Mary Eades // *Comparative biochemistry and physiology part. – USA*. – 2003. – P. 95–112.
13. Ginsberg Henry N. Insulin resistance and cardiovascular disease / N. Henry Ginsberg // *Journal of clinical investigation. New York*. – 2000. – Vol. 106, № 4. – P. 453–457.
14. Hyperinsulinemia, insulin resistance and hyperglycemia: contributing factors in pathogenesis of hypertension and atherosclerosis / J.R. Sowers, P.R. Standley, J.L. Ram [et al.] // *Am. J. Hypertens.* – 1993. – V. 6. – P. 260–270.
15. Компоненты метаболического синдрома у больных с артериальной гипертензией / М.Н. Мамедов, Н.В. Перова, В.А. Метельская [и др.] // *Кардиология*. – 1997. – № 12. – С. 37–41.
16. Stamler J. Diabetes, other risk factors and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial / J. Stamler, O. Vaccaro, J.D. Neaton [et al.] // *Diabetes Care*. – 1993. – Vol. 16. – P 434–444.
17. Kaplan N.M. The deadly quartet: upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia and hypertension / N.M. Kaplan // *Arch. Intern. Med.* – 2009. – V. 149. – P. 1514–1520.
18. Бритов А.Н. Профилактика артериальной гипертензии на популяционном уровне: возможности и актуальные задачи / А.Н. Бритов // *Русский медицинский журнал*. – 1997. – № 5. – С. 571–576.
19. Исследование природы взаимодействий инсулина с поверхностью эритроцитов и состава гормонтранспортирующего комплекса плазмы крови человека / О.С. Елисеева, Н.А. Киреева, А.С. Першина [и др.] // *Вестник ОГУ*. – 2009. – № 6. – С. 476–478.
20. Drabkin D. A simplified technique for large crystallisation of haemoglobin in the enistalline / D. Drabkin // *Fnn N. S. Acad. Sci.*, 1964 – Vol. 121, № 11 – P. 404–407.

21. Долгов В.В. Лабораторная диагностика нарушений обмена углеводов / В.В. Долгов, Т.Ю. Демидова. – Москва: Практика, 2002. – 80 с.
22. Базарнова М.А. Руководство по клинической лабораторной диагностике / М.А. Базарнова, В.Т. Морозова. – Киев: Вища школа, 1986. – 175 с.
23. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике / В.В. Меньшиков, Л.Н. Делекторская. – Москва: Медицина, 1987. – С.215–228.
24. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В.С. Камышников. – Москва: Медпрес – информ, 2004. – 451 с.
25. Хаггинс Ч. Расшифровка клинических лабораторных анализов / Чарльз Б. Хаггинс, пер. с англ. В.Л. Эмануэля. – Москва: Бином, 2004. – С. 41–87.
26. Дубинина Е. Окислительная модификация белков / Е. Дубинина, В. Шугалей // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113, Вып. 1. – С. 71–81.
27. Скрининговый метод определения средних молекул в биологических жидкостях. Метод. рекоменд. / [Н.И. Габриэлян, Э.Р. Левицкий, А.А. Дмитриев и др.] – М.: Медицина, 1985. – 18 с.
28. Гаврилов В.Б. Определение тирозин- и триптофансодержащих пептидов в плазме крови по поглощению в УФ-области спектра / В.Б. Гаврилов, Н.Ф. Лобко, С.В. Конев // Клин. лаб. диагн. – 2004. – Вып.3. – С. 12–16.
29. Tomasevic N. Insulin-induced glycosylphosphatidylinositol (GPI) binding to red cell membrane proteins / N. Tomasevic, M. Nikolic, V. Niketic // J. Serb. Chem. Soc. – 2002. – Vol. 67, № 12 – С. 819–824.
30. Lochs H. Uptake and metabolism of dipeptides by human red blood cells / Herbert Lochs, L. Morse Emile, A Siamak // Biochem. J. – 1990. – Vol. 271. – P. 133–137.
31. Абакумова Ю.В. Свободнорадикальное окисление при атеросклерозе как патогенный фактор / Ю.В. Абакумова, Н.А. АрдаMATский // Медико-биологический вестник им. Я.Д. Витебского. – 1996. – Т. 21. – Вып. 2. – С. 15–21.
32. Калусев А.В. Выполняют ли регуляторную роль в клетке взаимодействия АФК с ДНК? / А.В. Калусев // Український біохімічний журнал. – 1999. – Т. 71. – Вып. 2. – С. 104–108.
33. Зенков Н.К. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты / Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. – М.: МАИК, 2001. – 343 с.
34. Зайцев В.Г. Активные формы кислорода (синопсис) / В.Г. Зайцев // Успехи современной биологии. – 2004. – Вып. 2. – С. 69–75.
35. Кутлубаев М.А. Свободнорадикальное окисление и его регуляция психотропными препаратами в условиях хронического стресса (клинико-экспериментальное исследование): автореф. дис. на соискание ученой степени кандидата медицинских наук: спец. 14.00.16 «Патологическая физиология» / М.А. Кутлубаев. – Омск, 2007. – 22 с.
36. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / Valko Marian, Dieter Leibfritz, Jan Moncol [et al.] // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. – 2007. – Vol. 39. – P. 44–84.
37. Кулинский В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита / В.И. Кулинский // Соросовский Образовательный Журнал. – 1999. – № 1. – С. 2–7.
38. Скулачев В.П. Кислород в живой клетке: Добро и зло / В.П. Скулачев // Соросовский Образовательный Журнал. – 1996. – № 3. – С. 4–10.
39. Соколовский В.В. Тиоловые антиоксиданты в молекулярных механизмах неспецифической реакции организма на экстремальное воздействие / В.В. Соколовский // Вопр. мед. химии. – 1988. – № 34 (6). – С. 2–11.
40. Свободные радикалы в живых системах / Ю.А. Владимиров, О.А. Азизова, А.И. Деев [и др.] // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. – 1991. – Т. 29. – С. 3–15.
41. Голубев А.Г. Изнанка метаболизма / А.Г. Голубев // Биохимия. – 1996. – Т.61, Вып. 11. – С. 2018–2026.
42. Биохимия человека. Т.2 / [Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В.]; пер. с англ. М.Д. Гроздовой. – Москва: МИР, 1993. – 415 с.



**Нікольська В.О.** Зміни біохімічних показників еритроцитів крові під впливом експериментальної гіперінсулінемії / **В.О. Нікольська** // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2010. – Т. 23 (62), № 3. – С. 89-97.

Наведено дані, що свідчать про те, що вплив експериментальної гіперінсулінемії призводить до реципрокних змін вмісту молекул середньої маси в гемолізаті еритроцитів крові лабораторних щурів і підвищенню активності каталази. Методом визначення окисної модифікації білків встановлена активація перекисних процесів в еритроцитах крові з утворенням альдегідних і кетонних продуктів нейтрального й основного характеру.

**Ключові слова:** гіперінсулінемія, еритроцити крові, окислювальна модифікація, молекули середньої маси.

**Nikolskaya V.A.** Changes of biochemical indexes of red blood cells effects in experimental hyperinsulinemia / **V.A. Nikolskaya** // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2010. – Vol. 23 (62), No 3. – P. 89-97.

Evidence that the effects of experimental hyperinsulinemia leads to reciprocal changes in the content of middle molecules in hemolysate red blood cells of laboratory rats and increased activity of catalase has presented. By the method of determining the oxidative modification of proteins activation of peroxidation processes in erythrocytes with the formation of aldehyde and ketonic products of neutral and basic character is established.

**Keywords:** hyperinsulinemia, erythrocytes, oxidative modification, middle molecules.

*Поступила в редакцію 19.10.2010 г.*