

УДК 577.112.4:598/599

ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРИНСУЛИНЕМИИ НА ПРОЦЕССЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ В ТКАНЯХ ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС

Никольская В.А., Рубановская Т.В.

Методом определения окислительной модификации белков в тканях печени, мозга и сердца установлено, что состояние экспериментальной гиперинсулинемии приводит к активации окислительных процессов и деструкции белков изученных тканей с образованием продуктов окислительной модификации аминокислотных остатков (альдегидных и кетонных продуктов нейтрального и основного характера). Купирование гиперинсулинемии глюкозой позволяет снизить показатели окисленных продуктов.

Ключевые слова: гиперинсулинемия, гипогликемия, окислительная модификация белков.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение биохимического аспекта влияния на организм гиперинсулинемического состояния, проявляющегося гипогликемическим симптомокомплексом, является несомненно актуальным в связи с тем, что его проявление достаточно часто встречается в лечебной практике; кроме того искусственно вызванная гиперинсулинемия применяется в лечении психических расстройств. Гиперинсулинемическое состояние может быть вызвано различными причинами [1, 2] и обусловлено абсолютным или относительным повышением уровня инсулина. При этом особую значимость имеют гипогликемии у больных сахарным диабетом, развивающиеся на фоне инсулинотерапии, реже при лечении сахароснижающими сульфаниламидными препаратами, что в свою очередь может вызывать диагностические ошибки и трудности [2].

Инсулин усиливает транспорт гексоз и аминокислот через цитолемму клеток тканей, снижая их уровень в крови, синтез гликогена, белков и липосинтез [1]. В то же время инсулин предохраняет гексозофосфаты от расщепления, тормозит глюконеогенез и липолиз. Снижение глюкозы крови под воздействием избыточной секреции инсулина (например, в случае опухоли островковых клеток Лангерганса, врожденной гиперинсулинемии) либо введении больших доз инсулина может привести к гипогликемии [3].

В процессе метаболизма в клетках аэробных организмов постоянно образуются активные формы кислорода (АФК), которые при избыточной их продукции либо при нарушении работы защитных систем могут оказывать токсическое действие и приводить к окислительной модификации фактически всех аминокислот, вызывая деградацию очищенных белков, белков интактных клеток и интрацеллюлярных

органелл [4, 5], к разрушению структуры мембран клеток и, как следствие, к окислительному повреждению тканей и органов [4, 6]. Накопление продуктов свободнорадикального окисления ведет к истощению антиоксидантной системы, снижению содержания восстановленного глутатиона и активности супероксиддисмутазы и каталазы. Одним из серьезных нарушений энергетического обмена при усилении свободнорадикального окисления является разобщение дыхания и фосфолирирования, а следовательно, и ослабление биосинтеза макроэргических соединений, особенно АТФ. Это, в свою очередь, затормаживает процессы биосинтеза белков, нуклеиновых кислот и других соединений, а также нарушает функции организма [7, 8].

В связи с этим, целью данной работы было исследование влияния экспериментальной гиперинсулинемии на процессы окислительной модификации белков тканей органов лабораторных крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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. Материалом служили ткани печени, сердца и мозга следующих групп лабораторных крыс: контрольной; группы в состоянии выраженной гиперинсулинемии (опытная группа №1); группы в состоянии гипогликемии с последующим купированием глюкозой (опытная группа №2). Экспериментальную гиперинсулинемию получали по схеме, описанной ранее. Опытным крысам натошак подкожно вводили по 3,5 Ед инсулина. После появления судорог, развития гипогликемической комы, часть животных декапитировали. Остальным крысам для купирования комы вводили внутривентриально по 3,5 мл 20% раствора глюкозы. После исчезновения признаков гиперинсулинемии животных декапитировали. Контрольные животные получали в таком же объеме физиологический раствор.

Из печени, сердца и мозга получали гомогенаты тканей [9], которые хранили не более недели. Полученные гомогенаты использовали для проведения методики определения белков, подверженных окислительной модификации.

Для анализа использовали 0,1 мг гомогената тканей крыс. Осаждение белков гомогената осуществляли с помощью 20% раствора трихлоруксусной кислоты. Далее использовали метод Е.Е. Дубининой, С.О. Бурмистрова, Д.А. Ходова, И.Г.Поротова [10] для определения окислительной модификации белков сыворотки крови. 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). Степень окислительной модификации белков выражали в единицах оптической плотности, отнесенных на 1 мг ткани (е.о.п./мг).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных исследований свидетельствуют, о том, что воздействие инсулинового шока приводит к увеличению степени окислительной модификации белков: содержания альдегид – динитрофенилгидразонов и кетон – динитрофенилгидразонов как нейтрального, так и основного характера в исследуемых тканях опытных групп лабораторных крыс по сравнению с контрольной (табл. 1, 2, 3).

Перегрузка дыхательной цепи митохондрий при активном гликолизе приводит к тому, что молекула кислорода способна присоединять один электрон, образуя супероксиданион – радикал $\bullet\text{O}_2^-$. В этих условиях супероксиданион – радикал претерпевает превращения, приводящие к образованию других высокореакционных радикалов, которые могут причинить прямой вред клетке: $\bullet\text{O}_2^-$, H_2O_2 , OH^\bullet [7, 8]. Утилизация глюкозы крови при воздействии избыточных доз инсулина способствует снижению процессов гликолиза и ослаблению биосинтеза АТФ. При адаптации организма к стрессовым ситуациям для быстрого образования и получения АТФ имеют место более короткие пути тканевого дыхания: отщепившиеся в процессе окисления в цикле Кребса атомы водорода переносятся на флавиновые ферменты электронотранспортной цепи митохондрий, минуя систему никотинамидных ферментов, при этом образуется всего две молекулы АТФ вместо трех. Более коротким путем быстрого получения АТФ является перенос атомов водорода с окисляемых субстратов с помощью флавиновых ферментов непосредственно на молекулярный кислород, минуя систему цитохромов. Конечным продуктом окисления в этих случаях будет не вода, а пероксид водорода [8]. Повышение скорости образования свободных радикалов нарушает работу антиоксидантных систем (АО), а следовательно, ведет к накоплению АФК, избыточная продукция которых оказывает токсическое действие и приводит к окислительному повреждению тканей и органов [4, 6].

Таблица 1.
Содержание 2,4-динитрофенилгидразонов в ткани печени лабораторных крыс,
е.о.п./мг ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)

Экспериментальные группы	n	Длина волны, нм			
		346	370	430	530
Контрольная группа	30	0,041±0,002	0,053±0,001	0,022±0,002	0,008±0,001
Опытная группа №1	30	0,051±0,006*	0,060±0,001*	0,030±0,001*	0,011±0,001*
Опытная группа №2	30	0,050±0,001*	0,059±0,001*	0,030±0,001*	0,011±0,001*

Примечание: * – достоверность различий показателей по сравнению с контрольной группой (p<0,01).

После введения избыточных доз инсулина в ткани печени (табл. 1) наблюдается достоверное увеличение содержания альдегидных продуктов нейтрального характера на 24% ($\lambda=346$ нм), кетонных продуктов нейтрального характера – на 13% ($\lambda=370$ нм), продуктов окислительной модификации аминокислотных остатков основного характера – на 36% ($\lambda=430$ и 530 нм).

После введения глюкозы достоверных изменений показателя окислительной модификации белков в ткани печени крыс не показано.

В ткани головного мозга (табл. 2) после введения избыточных доз инсулина содержание окислительных продуктов нейтрального характера возрастает в 1,4 раза, альдегидных продуктов основного характера ($\lambda=430$ нм) – в 2 раза, кетонных продуктов основного характера ($\lambda=530$ нм) – в 5 раз.

Таблица 2.

Содержание 2,4 – динитрофенилгидразонов в ткани головного мозга лабораторных крыс, е.о.п./мг ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)

Экспериментальные группы	n	Длина волны, нм			
		346	370	430	530
Контрольная группа	30	0,037±0,001	0,039±0,001	0,015±0,002	0,010±0,001
Опытная группа №1	30	0,051±0,001*	0,054±0,001*	0,031±0,002*	0,051±0,002*
Опытная группа №2	30	0,048±0,001*, **	0,050±0,001*, **	0,030±0,002*	0,050±0,001*

Примечание: * – достоверность различий показателей по сравнению с контрольной группой ($p<0,01$); ** – достоверность различий показателей опытной группы №2 по сравнению с опытной группой №1 ($p<0,01$).

После введения глюкозы достоверно снижается на 30% содержание альдегидных ($\lambda=346$ нм) и кетонных ($\lambda=370$ нм) продуктов окислительной модификации нейтрального характера, большая часть которых может быть продуктами окислительной модификации гидрофобных аминокислотных остатков. Возможно, полученные результаты являются подтверждением того, что окислительную модификацию претерпевают аминокислотные остатки не только в поверхностных слоях, но и в более глубоких участках белковых молекул ткани, где они также подвержены окислительной деградации при воздействии АФК [4].

Фактором, усиливающим окислительный стресс в ткани головного мозга, является закисление среды, вызванное происходящей при гипоксии активацией гликолиза. При этом образование АТФ уменьшается [7]. Поэтому после введения глюкозы и восстановления кровообращения появляющийся в тканях кислород взаимодействует с промежуточными компонентами дыхательной цепи, убихинонами, которые обладают к нему более высоким сродством. Такое взаимодействие происходит по одноэлектронному пути и заканчивается образованием супероксиданион-радикала [7]. В результате этого купирование

гипогликемии глюкозой в ткани головного мозга не привело к снижению показателей окислительной модификации белков.

Таблица 3.
Содержание 2,4–динитрофенилгидразонов в ткани сердца лабораторных крыс,
е.о.п./мг ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)

Экспериментальные группы	n	Длина волны, нм			
		346	370	430	530
Контрольная группа	30	0,020±0,001	0,021±0,002	0,011±0,002	0,010±0,001
Опытная группа №1	30	0,040±0,002*	0,050±0,003*	0,030±0,002*	0,024±0,001*
Опытная группа №2	30	0,030±0,002*, **	0,025±0,002*, **	0,020±0,002*, **	0,010±0,001**

Примечание: * – достоверность различий показателей по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$); ** – достоверность различий показателей опытной группы №2 по сравнению с опытной группой №1 ($p < 0,01$).

В ткани сердца лабораторных крыс (табл. 3) после введения избыточных доз инсулина содержание продуктов окислительной модификации белков по сравнению с контрольной группой возрастает почти в 2 – 2,5 раза при всех длинах волн, регистрирующих данные соединения (рис. 1).

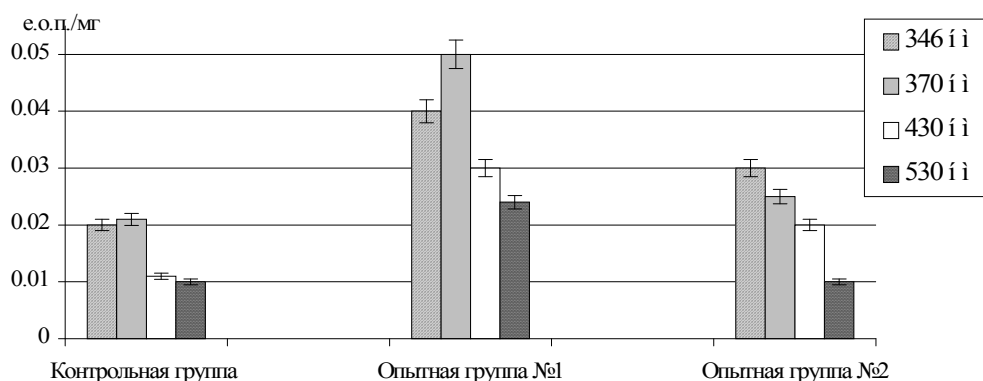


Рис. 1. Содержание продуктов окислительной модификации белков в ткани сердца лабораторных крыс контрольной и опытной групп.

После купирования комы глюкозой в ткани сердца опытной группы №2 наблюдается достоверное снижение содержания продуктов окислительной модификации белков: альдегидных – в 1,5 раза, кетонных – в 2 раза по сравнению с показателем опытной группы №1.

Снижение изученных показателей в ткани сердца могут являться отражением на биохимическом уровне сопряжения состояния данного органа и изменений концентрации глюкозы в постоянной циркулирующей крови [8].

Результаты исследований позволяют предположить, что изменения показателя окислительной модификации белков в тканях лабораторных крыс могут быть обусловлены резким снижением содержания углеводов под воздействием экспериментальной гиперинсулинемии, что приводит к уменьшению скорости гликолитических процессов, ослаблению биосинтеза АТФ с последующей интенсификацией окислительных реакций

ВЫВОДЫ

1. В условиях гиперинсулинемии в ткани печени лабораторных крыс происходит достоверное увеличение содержания продуктов окислительной модификации белков нейтрального характера на 24% ($\lambda=346$ нм) и 13% ($\lambda=370$ нм), основного характера – на 36% ($\lambda=430$ и 530 нм).
2. Показано, что в ткани головного мозга лабораторных крыс в условиях гиперинсулинемии уровень продуктов окислительной модификации белков нейтрального характера повышается в 1,4 раза, основного характера – в 2 – 5 раз, в ткани сердца наблюдается достоверное увеличение содержания продуктов окислительной модификации белков в 2 – 2,5 раза.
3. Выявлено, что после гипогликемического шока в ткани печени лабораторных крыс изменений показателя окислительной модификации белков не наблюдается.
4. После купирования гипогликемического шока глюкозой в ткани головного мозга лабораторных крыс выявлено достоверное уменьшение показателя окислительной модификации белков нейтрального характера на 30%, тогда как изменения показателя окислительной модификации белков основного характера не наблюдается.
5. Показано, что после введения глюкозы лабораторным крысам, находящимся в состоянии искусственно вызванной гиперинсулинемии, содержание продуктов окислительной модификации белков в ткани сердца уменьшается в 1,3 – 2,4 раза относительно контрольной группы.

Список литературы

1. Ефимов А. С. Эндокринология / Ефимов А. С., Боднар П. Н., Зелинский Б. А. – К.: Вища школа, 1983. – С. 171 – 173.
2. Ефимов А. С. Неотложная эндокринология / Ефимов А. С., Комисаренко И. В., Скробонская Н. А. – М.: Медицина, 1982. – 36 с.
3. Теппермен Дж. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. Вводный курс / Дж. Теппермен, Х. Теппермен; пер. с англ. В. И. Кандрора – М.: Мир, 1989. – 656 с.
4. Дубинина Е. Окислительная модификация белков / Елена Дубинина, Владимир Шугалей // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113, Вып. 1. – С. 71 – 81.
5. Зенков Н. К. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты / Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меньщикова Е. Б. – М.: МАИК, 2001. – 343 с.

6. Зайцев В. Г. Активные формы кислорода (синопсис) / В. Г. Зайцев // Успехи современной биологии. – 2004. – Вып. 2. – С. 69 – 75.
7. Болдарев А. Свободные радикалы в нормальном и ишемическом мозге / Александр Болдарев, Михаил Куклей // Нейрохимия. – 1996. – №13. – С. 271 – 278.
8. Владимиров Ю. А. Свободные радикалы в клетке / Ю. А. Владимиров // Природа. – 1997. – №4. – С. 47 – 54.
9. 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.
10. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения / Е. Е. Дубинина, С. О. Бурмистров, Д. А. Ходов [и др.] // Вопросы медицинской химии. – 1995. – Т. 41, Вып. 1. – С. 24 – 25.
11. Дурнев А. Д. Мутагены. Скрининг и фармакологическая профилактика воздействия / А. Дурнев, С. Середенин. – М.: Медицина, 1998. – 328 с.

Нікольська В. О., Рубановська Т. В. Вплив експериментальної гіперінсулінемії на процеси окисної модифікації білків у тканинах лабораторних щурів // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2009. – Т.22 (61). – № 2 – С. 103-109.

Методом визначення окисної модифікації білків у тканинах печінки, мозку і серця встановлено, що стан експериментальної гіперінсулінемії приводить до активації окисних процесів і деструкції білків вивчених тканин з утворенням продуктів окисної модифікації амінокислотних залишків (альдегідних і кетонних продуктів нейтрального й основного характеру). Купірування гіперінсулінемії глюкозою дозволяє знизити показники окислених продуктів.

Ключові слова: гіперінсулінемія, гіпоглікемія, окисна модифікація білків.

Nikolskaya V.A., Rubanovskaya T. V. Influence experimental hyperinsulinemia on processes of oxidative modifications of proteins in tissue laboratory rats // Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V. I. Vernadskogo. Series «Biology, chemistry». – 2009. – V.22 (61). – № 2. – P. 103-109.

By method of definition of oxidative modifications of proteins in tissue of a liver, a brain and heart it is established, that the state experimental hyperinsulinemia leads to activation of oxidative processes and destruction proteins of the studied tissue with formation of products of oxidative modifications aminoacids the residual (aldehydic and ketonic products of neutral and basic character). Knocking over hypoglycaemia glucose allows to lower indicators of the oxidised products.

Keywords: hyperinsulinemia, hypoglycaemia, oxidative modifications of proteins.

Поступила в редакцію 12.05.2009 г.