

©Епринцев, Селиванова

ВЛИЯНИЕ ФИТОПРОТЕКТОРОВ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ NAD⁺- И NADP⁺-МАЛИК-ЭНЗИМОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ

А.Т. Епринцев*, Н.В. Селиванова

Воронежский государственный университет,
394018, Воронеж, Университетская пл., 1; *эл. почта: bc366@bio.vsu.ru

Показано увеличение активности NAD⁺- и NADP⁺-зависимых малик-энзимов (МЭ; NAD⁺-МЭ, КФ 1.1.1.39 и NADP⁺-МЭ, КФ 1.1.1.40) в печени крыс при развитии аллоксанового диабета, связанное с усилением скорости транскрипции кодирующих данные ферменты генов. Пероральное введение водных экстрактов топинамбура и оливы крысам с диабетом способствовало заметному снижению концентрации глюкозы в крови крыс при развитии патологии, приводило к уменьшению скорости транскрипции исследуемых генов; активность МЭ принимала значения, близкие к норме. Предлагается использовать экстракты топинамбура и оливы в качестве дополнительных средств терапии сахарного диабета.

Ключевые слова: малик-энзим; декарбоксилирующая малатдегидрогеназа; диабет; аллоксан; активность; экспрессия; ген; изофермент; фитопротектор

DOI: 10.18097/PBMC20236902104

ВВЕДЕНИЕ

Хроническое нарушение обмена веществ при сахарном диабете (СД) представляет глобальную проблему с огромными социальными, медицинскими и экономическими последствиями [1]. Подобно ряду других заболеваний, таких как рак и нейродегенеративные расстройства, развитие СД связано с окислительным стрессом [2]. Известно, что NADPH служит субстратом NADPH-оксидаз, которые продуцируют активные формы кислорода. Кроме того, NADPH участвует и в клеточной антиоксидантной защите (превращение окисленного глутатиона в восстановленную форму с помощью NADPH-глутатионредуктазы) [3].

Малик-энзимы, или декарбоксилирующие малатдегидрогеназы (МЭ; NAD⁺-МЭ, КФ 1.1.1.39 и NADP⁺-МЭ, КФ 1.1.1.40), расположенные в цитоплазматических (МЭ1) и митохондриальных (МЭ2, МЭ3) компартментах, катализируют окислительное декарбоксилирование малата до пирувата, одновременно накапливая восстановительные эквиваленты в форме NADPH (МЭ1, МЭ2, МЭ3) или NADH (МЭ2) [4]. Поэтому считается, что МЭ играют важную роль в субстратном обеспечении глюконеогенеза, гликолиза и синтеза жирных кислот, а также принимают участие в антиоксидантной защите клеток.

В последнее время растёт интерес к использованию растительных экстрактов для профилактики и лечения пациентов с СД и связанных с ним осложнений [5]. Топинамбур (*Helianthus tuberosus* L.) культивируется во многих странах, в том числе и в России. При пероральном приеме препараты топинамбура оказывали позитивное действие на контроль гликемии у людей и животных, в связи с этим его рассматривают в качестве лекарственного растения [6]. Основным компонентом фруктанов и пищевых волокон,

присутствующих в топинамбуре, является инулин. Введение инулина, выделенного из клубней топинамбура, в течение двух месяцев улучшало гликемический контроль и снижало ожирение у больных диабетом [7]. Олеуропеин — основной фенольный компонент оливы (*Olea europaea* L.) — привлёк внимание учёных благодаря нескольким полезным для здоровья свойствам, таким как антиоксидантное, противовоспалительное, кардио- и нейрозащитное, а также противораковое. Показано благотворное влияние олеуропеина на такие заболевания, как сахарный диабет, хронические заболевания почек и рак [8].

В связи с этим, целью данной работы было исследование особенностей функционирования изоферментов малик-энзимов в гепатоцитах крыс при аллоксановом диабете и выяснение влияния водных экстрактов топинамбура (ВЭТ) и оливы (ВЭО) на активность и скорость транскрипции декарбоксилирующих малатдегидрогеназ в печени крыс при патологии.

МЕТОДИКА

Объект исследования

Объектом исследования были самцы белых лабораторных крыс линии Wistar массой 150-200 г, выведенные в биопитомнике “Стезар” (Владимир). Животных содержали в условиях вивария при стандартной температуре с естественным освещением и свободным доступом в течение дня к воде и корму.

Постановка эксперимента

Индукцию сахарного диабета вызывали путём однократной внутрибрюшинной инъекции 5% (масса/объём) моногидрата аллоксана

в 0,9% (масса/объем) растворе цитрата натрия в дозе 150 мг/кг массы тела [9]. Контрольным животным вводили 0,9% (масса/объем) раствор цитрата натрия. Забор крови из хвостовой вены проводили утром натощак в стерильных условиях в соответствии с санитарными правилами. Уровень глюкозы измеряли глюкометром Сателлит плюс (“ЭЛТА”, Россия). Спустя 14 суток наркотизированных животных подвергали декапитации. Анализ биоматериала (печень) проводили через 14 суток после моделирования аллоксанового диабета. После проявления признаков диабета тридцать шесть крыс были случайным образом разделены на три группы по двенадцать крыс в каждой: “Диабет” — диабетические крысы, “Диабет + ВЭТ” и “Диабет + ВЭО” — животные с аллоксановым диабетом, принимавшие экстракт топинамбура и экстракт оливы соответственно. В качестве контроля использовали четвертую группу крыс (“Норма”, $n=12$), которым аллоксан не вводили. Крысы из групп “Норма” и “Диабет” получали дистиллированную воду, а “Диабет + ВЭТ” и “Диабет + ВЭО” — водные экстракты топинамбура и оливы соответственно ежедневно в течение 14 дней.

Получение растительных экстрактов

Для приготовления водного экстракта клубней топинамбура (*H. tuberosus*) использовали сухое растительное сырье, которое измельчали в порошок, заливали горячей водой, в соотношении 5 г сырья на 100 мл воды, настаивали 24 ч, фильтровали и добавляли в поилки в дозе 60 мг/кг массы тела один раз в сутки. Для приготовления водного экстракта оливы использовали сухие листья, измельченные в порошок, 10 г которого смешивали со 100 мл кипящей дистиллированной воды, настаивали 24 ч, фильтровали и помещали надосадочную жидкость в сушильный шкаф на 30 мин при температуре 100°C для получения сухого порошка экстракта. Порошок растворяли в дистиллированной воде и добавляли в поилки в дозе 100 мг/кг массы тела [10].

Выделение МЭ и измерение их активности

Для получения гомогената печень крыс растирали в ступке на холоде в соотношении 1:5 (1 г печени на 5 мл среды выделения) к среде выделения (50 mM трис-HCl буфер, pH 6,5; 1 mM EDTA, 2 mM KCl, 3 mM DTT) и центрифугировали 5 мин при 3000 g и 4°C. Полученный супернатант использовали в дальнейших исследованиях.

Измерение активности МЭ

Активность МЭ определяли спектрофотометрически при 340 нм по снижению оптической плотности вследствие расщепления NAD(P)H. Для определения скорости восстановления пирувата использовали среду, содержащую 100 mM трис-HCl, pH 6,5 для NAD⁺-малик-энзима и 50 mM трис-HCl, pH 6,5 для NADP⁺-малик-энзима; 1,5 mM пируват, 0,15 mM NADH или NADPH. В качестве кофермента МЭ и ингибитора оксидоредукционных

малатдегидрогеназ использовали 2 mM MnCl₂. За единицу активности (Е) МЭ принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 мкмоль субстрата в 1 мин при 25°C.

Для определения содержания белка использовали метод Лоури. Активность ферментов выражали в виде общей (Е/г сырой массы печени) и удельной (Е/мг белка) активности.

Исследование изоферментного состава МЭ

Для анализа изоферментного состава МЭ из гепатоцитов крыс проводили электрофорез в полиакриламидном геле по модифицированной методике Дэвиса в двух полиакриламидных гелях различной концентрации [11]. Нижний гель (8%): 8% раствор акриламид/метиленбисакриламид (А/В; 74:1; масса/объем); 1,5 M трис-HCl, pH 8,8; 3 mM свежеприготовленный раствор персульфата аммония; 3 mM TEMED. Верхний гель (4%): 4% раствор А/В; 0,5 M трис-HCl, pH 6,8; 3 mM персульфат аммония; 3 mM TEMED. В качестве электродного использовали трис-глициновый (0,025 M трис-HCl – 0,192 M глицин) буфер, pH 8,3. В качестве контроля за движением линии фронта использовали бромфеноловый синий (0,01% (масса/объем) раствор). На один карман пластинки геля подавали постоянный электрический ток 1,5–2,5 мА [12]. Все процедуры проводили при 4°C. Специфическое проявление фермента в геле осуществляли тетразолиевым методом в среде следующего состава: 100 mM трис-HCl буфер, pH 6,5 для NAD⁺-МЭ и 50 mM трис-HCl буфер, pH 6,5 для NADP⁺-МЭ; 2 mM малат натрия; 3 mM NAD(P)⁺; 0,01 M нитросиний тетразолий (НСТ) (предварительно растворенный в 0,5 мл этиленгликоля); 0,01 M феназинметасульфат (ФМС). В карман геля вносили 5 мкг белка исследуемого раствора. Электрофоретическую подвижность (R_f) определяли как отношение длины, пройденной белковой полосой, (L_1) к длине, пройденной фронтом красителя, (L_2): $R_f = L_1 / L_2$.

Выделение РНК

Суммарную клеточную РНК выделяли с помощью метода гуанидинизотиоционат-фенол-хлороформной экстракции с использованием в качестве осадителя LiCl [13]. Для визуализации и анализа качества выделенной РНК применяли электрофорез в 1% агарозном геле (масса/объем). Окрашивание геля осуществляли 0,1% спиртовым раствором бромистого этидия. Обратную транскрипцию мРНК проводили с использованием фермента M-MuLV обратной транскриптазы и праймерами олиго(dT) (“СибФермент”, Россия) для синтеза первой цепи кДНК согласно инструкции производителя.

Подбор праймеров

Специфические праймеры подбирали с использованием нуклеотидных последовательностей генов крысы *me-1*, *me-2* и *me-3*, взятых из международной базы данных NCBI [14], с помощью программы Primer-BLAST [15].

Полученные олигонуклеотидные последовательности прошли проверку на специфичность к исследуемым генам в программе BLAST [16] и на образование шпилек и других вторичных структур в программе Clustal Omega [17]. На основании проанализированных последовательностей были подобраны специфические праймеры для *me-1*, *me-2* и *me-3* генов декарбоксилирующих малатдегидрогеназ (МЭ) крысы (табл. 1).

Проведение ПЦР в реальном времени

Полимеразную цепную реакцию проводили на ПЦР анализаторе Bio-Rad DNA Engine Thermal Cycler Chromo 4 (“Bio-Rad”, США), в качестве реактивов были использованы наборы Экстра-микс для ПЦР HS-Taq PCR (“Диаэм”, Россия). Краситель, применяемый в работе, — SYBR Green I (“Евроген”, Россия). Параметры амплификации: предварительная денатурация 95°C — 5 мин, затем цикл: 95°C — 20 с, 58°C — 30 с, 72°C — 40 с (детекция), финальная элонгация 72°C — 10 мин. Количество кДНК контролировали с использованием параллельной амплификации фактора элонгации *ef-1α* и разработанными нами ген-специфичными праймерами. Отрицательным контролем служила суммарная РНК, не подвергшаяся обратной транскрипции. Относительный уровень экспрессии исследуемых генов определяли при помощи $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -метода [18] и программного обеспечения Opticon Monitor™ Software (“Bio-rad”).

Статистическая обработка данных

Опыты осуществляли в трёхкратной аналитической и пятикратной биологической повторностях. Для проведения статистического анализа использовали коммерческую программу Stattech v.1.2.0. Так как количество исследуемых показателей не превышало 50, соответствие нормальному распределению рассчитывали с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для описания количественных показателей, нормальное распределение которых было подтверждено, использовали расчёт среднего арифметического (М) и стандартного отклонения (СО), а также определяли границы 95-процентного доверительного интервала (95% ДИ). Сравнение трёх и более групп по количественному показателю, имеющему нормальное распределение, выполняли с помощью однофакторного дисперсионного анализа, апостериорные сравнения проводили с помощью критерия Тьюки (при условии равенства дисперсий).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Индукция экспериментального диабета

К началу эксперимента концентрация глюкозы в плазме крови всех крыс, взятых для эксперимента, находилась в пределах нормы ($4,9 \pm 0,12$ ммоль/л). Введение аллоксана подопытным животным способствовало увеличению концентрации глюкозы в крови до $14,8 \pm 0,30$ ммоль/л на второй день после инъекции; в группе “Диабет” этот показатель продолжал расти на протяжении всего времени исследования. У контрольных животных концентрация глюкозы находилась в пределах нормы и составляла $5,0 \pm 0,15$ ммоль/л в течение всего эксперимента. Воздействие аллоксана приводит к разрушению β-клеток островков в поджелудочной железе, вследствие чего возникает недостаток инсулина и развивается сахарный диабет I типа (рис. 1) [9]. Цикл редокс превращений приводит к образованию свободных радикалов, которые играют ключевую роль в дегенерации β-клеток [19].

Крысы из групп “Норма” и “Диабет” получали дистиллированную воду, в группе “Диабет+ВЭТ” воду заменяли на водный экстракт топинамбура в дозе 60 мг/кг массы тела [20], а в группе “Диабет + ВЭО” — на водный экстракт оливы в дозе 100 мг/кг массы тела [10] один раз в сутки в течение 14 дней. К концу эксперимента концентрация глюкозы в крови опытных групп крыс, принимавших растительные экстракты была выше, чем у животных контрольной группы, но достоверно ниже, чем у крыс группы “Диабет” (“Диабет” — $17,2$ [17,1 – 17,5] ммоль/л; “Диабет + ВЭТ” — $10,2$ [9,9 – 10,4] ммоль/л; “Диабет + ВЭО” — $12,6$ [12,2 – 13,0] ммоль/л). Причина снижения гипергликемии при употреблении водного экстракта листьев *H. tuberosus*, по всей вероятности, связана с тем, что нерасщеплённые молекулы инулина под действием соляной кислоты в желудке адсорбируют значительное количество глюкозы, поступившей с пищей. Кроме этого установлено, что фруктоза, проникая в клетки всех органов без участия инсулина, полноценно может заменить глюкозу в обменных процессах [21]. Известно, что в листьях оливы олеuropeин является наиболее распространённым фенольным компонентом [22]. Экспериментальные исследования продемонстрировали ценное воздействие олеuropeина и его продуктов, таких как гидрокситирозол, на различные биологические процессы, включая удаление свободных радикалов, а также

Таблица 1. Специфические праймеры для *me-1*, *me-2* и *me-3* генов, кодирующих МЭ крысы

Ген	Праймер	Последовательность	Температура отжига	Теоретический размер продукта, п.н.
<i>me-1</i>	Прямой	GAGAAAGAGGTGTTTGCCCA	58,0°C	249
	Обратный	GGAAACAGAGTCCGTCCATC		
<i>me-2</i>	Прямой	TCCGTACTACTTTGCTTGGC	58,0°C	328
	Обратный	GTGCTAGAGGACTGAGTGGA		
<i>me-3</i>	Прямой	CAATGCCCTATGTGTTTCCCG	58,0°C	253
	Обратный	GTTTGTACGCATAGTCGAGGA		

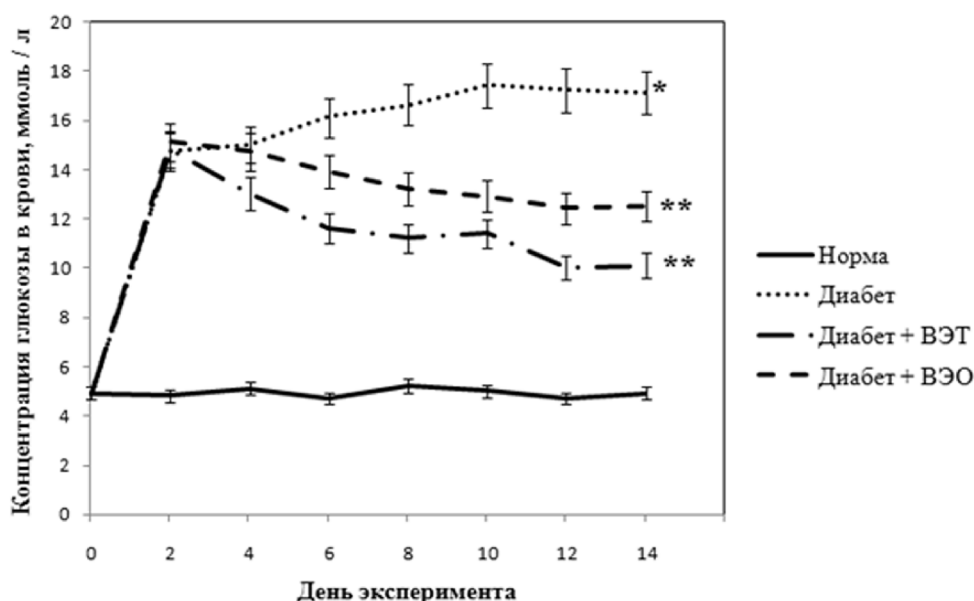


Рисунок 1. Динамика концентрации глюкозы в крови у здоровых крыс (“Норма”), животных с аллоксановым диабетом (“Диабет”) и крыс с аллоксановым диабетом, принимавших водные экстракты топинамбура (“Диабет + ВЭТ”) и оливы (“Диабет + ВЭО”). * – различия показателей между группами “Норма” и “Диабет” статистически значимы ($p=0,001$); ** – различия показателей между группами “Диабет”, “Диабет + ВЭТ” и “Диабет + ВЭО” статистически значимы ($p\leq 0,05$).

Таблица 2. Общая и удельная активность NAD^+ - и NADP^+ -МЭ в норме и при сахарном диабете, $p\leq 0,05$

Группа крыс	NADP^+ -МЭ, Е/г сырой массы	NADP^+ -МЭ, Е/мг белка	NAD^+ -МЭ, Е/г сырой массы	NAD^+ -МЭ, Е/мг белка
Норма	$12,4\pm 0,62$	$1,3\pm 0,25$	$11,3\pm 0,56$	$1,5\pm 0,21$
Диабет	$16,7\pm 0,84$	$2,1\pm 0,13$	$24,9\pm 0,24$	$2,9\pm 0,15$
Диабет + ВЭТ	$14,2\pm 0,74$	$1,5\pm 0,44$	$18,4\pm 0,92$	$1,8\pm 0,37$
Диабет + ВЭО	$14,9\pm 0,75$	$1,6\pm 0,36$	$20,8\pm 0,31$	$2,0\pm 0,46$

антигипергликемическое воздействие [23]. У кроликов с диабетом, получавших олеуропеин, отмечено снижение уровня глюкозы в крови [24]. Эти исследования подтверждают полученные нами данные, что экстракты топинамбура и оливы могут быть использованы в качестве дополнения к обычной терапии сахарного диабета.

Активность МЭ в печени крыс

Известно, что МЭ, локализованные в поджелудочной железе, играют важную роль в секреции инсулина [25, 26]. Однако информации об активности данных ферментов в печени в норме и при развитии СД нами найдено не было. Ранее нами было выявлено значительное увеличение активности NAD -зависимой оксидоредуктирующей малатдегидрогеназы [20] и лактатдегидрогеназы [27] в печени крыс. В данной работе выявлено увеличение общей активности NADP^+ -зависимого МЭ при сахарном диабете в 1,3 раза, а NAD^+ -зависимого МЭ в 2,2 раза, удельная активность увеличивалась в 1,6 и 1,9 раза соответственно (табл. 2). Полученные нами данные о повышении активности NADP^+ -МЭ в условиях аллоксанового диабета согласуются с литературными данными. Так, Савченко и соавт. в 2000 году показали увеличение активности NADP^+ -МЭ в лимфоцитах

детей с инсулинзависимым сахарным диабетом по сравнению с нормой [28]. Однако в конце прошлого столетия был опубликован ряд работ по регуляции инсулином экспрессии гена NADP^+ -МЭ, в которых было показано, что при диабете активность исследуемого фермента снижается, а введение инсулина приводит к восстановлению скорости его работы [29, 30]. Вероятно, подобные расхождения в результатах могут быть связаны с разной продолжительностью и условиями эксперимента, в исследовании Drake и соавт. крыс содержали на специальной богатой углеводами диете [30]. Следовательно, данный вопрос нуждается в дополнительных исследованиях.

Употребление лабораторными животными фитопротекторов приводило к снижению активности МЭ по отношению к величинам активности фермента в группе “Диабет”. Однако стоит отметить, что данного эффекта недостаточно для нормализации метаболических процессов.

Исследование изоферментного состава МЭ

Изменения в скорости работы ферментов могут быть связаны с вариациями в их изоферментном составе. Для этого были проведены электрофоретические исследования в полиакриламидном геле. Результаты

показали наличие в гомогенате здоровых крыс двух изоферментов NADP⁺-МЭ, различающихся по молекулярным массам с $R_f = 0,18$ и $R_f = 0,21$, и одной формы NAD⁺-МЭ с $R_f = 0,34$. Развитие сахарного диабета не приводило к появлению новых дополнительных изоформ (рис. 2). Анализ полученных данных позволяет предположить, что увеличение активности МЭ не связано

с появлением дополнительной изоформы, в отличие от NAD⁺-зависимой малатдегидрогеназы, обладающей оксидоредуктазной активностью (КФ 1.1.1.37), для которой нами ранее было выявлено появление при диабете дополнительной изоформы [19]. Вероятно, увеличение активности NAD⁺- и NADP⁺-МЭ при развитии патологии связано с усилением работы уже имеющихся форм фермента, а не с синтезом дополнительных белков.

Применение ВЭТ и ВЭО не приводило к изменению изоферментного состава исследуемых ферментов (данные не представлены).

Анализ экспрессии генов, кодирующих МЭ

Анализ базы данных GeneBank [31] показал, что у большинства млекопитающих, в том числе и у крыс, NADP⁺-МЭ кодируется двумя генами: *me-1* (цитоплазматический изофермент) и *me-3* (митохондриальный изофермент), NAD⁺-зависимую форму фермента кодирует один ген — *me-2*. Для анализа скорости экспрессии данных генов нами были подобраны специфические праймеры (табл. 1).

Для оценки скорости экспрессии генов, кодирующих NAD⁺- и NADP⁺-зависимые МЭ, была проведена полимеразная цепная реакция в реальном времени. На рисунке 3 показаны полученные результаты, из которых видно, что в условиях аллоксанового диабета наблюдается активизация скорости работы гена *me-1* в 9 раз; *me-2* — в 5,7 раз и *me-3* — в 2,6 раз относительно контрольной

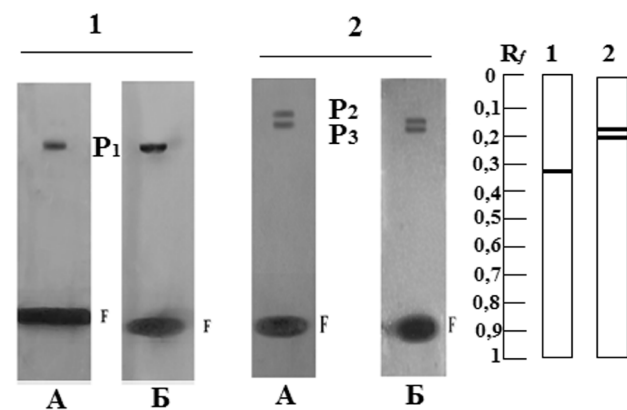


Рисунок 2. Распределение форм NAD⁺ (1) и NADP⁺-зависимых малик-энзимов (2) в гепатоцитах крыс. А – здоровые животные (“Норма”); Б – крысы с аллоксановым диабетом (“Диабет”); P1, P2, и P3 – белковые полосы, обладающие малик-энзимной активностью ($R_f = 0,34$; 0,18 и 0,21 соответственно); F – фронт красителя.

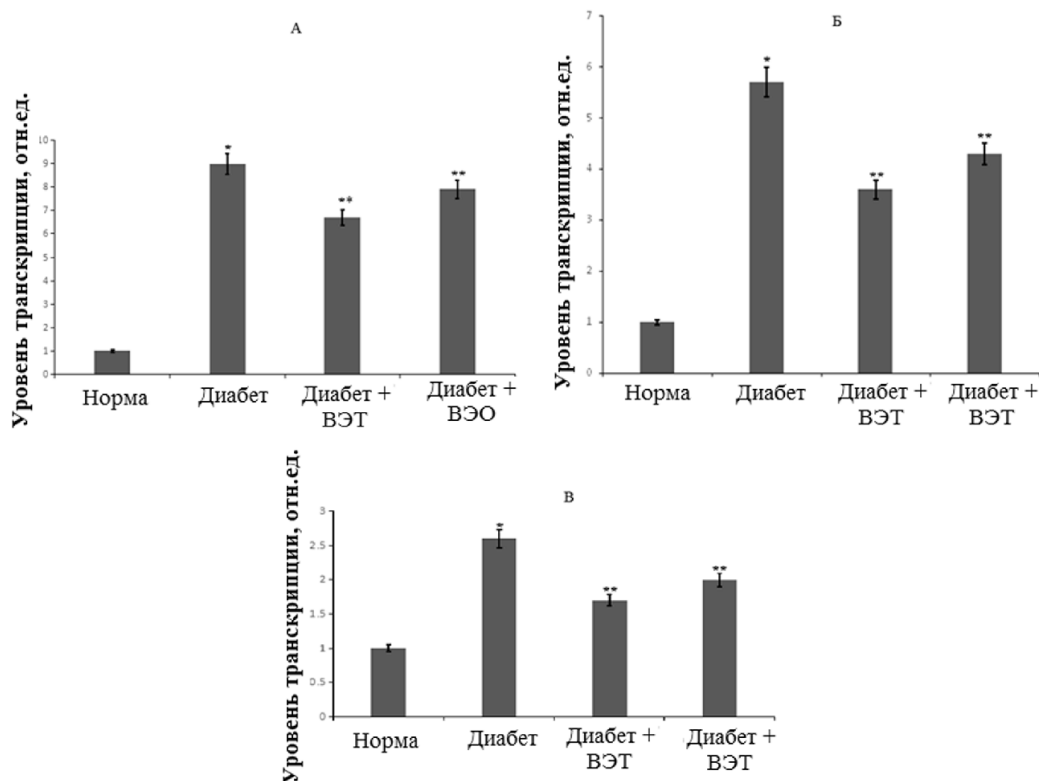


Рисунок 3. Относительный уровень транскрипции гена *me-1* (А), *me-2* (Б) и *me-3* (В) в печени здоровых крыс (“Норма”), животных с аллоксановым диабетом (“Диабет”), животных с индуцированным диабетом, получавших экстракт листьев топинамбура (“Диабет + ВЭТ”) или экстракт вытяжек оливы (“Диабет + ВЭО”). * – различия показателей между группами “Норма” и “Диабет” статистически значимы ($p \leq 0,05$); ** – различия показателей между группами “Диабет”, “Диабет + ВЭТ” и “Диабет + ВЭО” статистически значимы ($p \leq 0,05$).

группы. Полученные данные по уровням экспрессии генов, кодирующих NAD^+ - и NADP^+ -МЭ, в норме и при аллоксановом диабете коррелируют со значениями активности исследуемых ферментов в опытной и контрольной группах. Они позволяют предположить, что в печени крыс с аллоксановым диабетом происходит активный синтез дополнительных белков МЭ с целью активизации их работы. Известно, что в условиях недостатка глюкозы в клетках печени запускается процесс глюконеогенеза [32]. Вероятно, повышение активности и скорости работы декарбоксилирующих малатдегидрогеназ необходимо для образования пирувата, в том числе использующегося в глюконеогенетических процессах. Кроме того, дополнительные молекулы NADPH могут расходоваться на NADPH-зависимое восстановление глутатиона, который, в свою очередь, используется организмом на поддержание баланса окислительно-восстановительных процессов, нарушающегося при аллоксановом диабете [3].

При введении растительных экстрактов относительный уровень транскриптов исследуемых генов достоверно снижался, однако не достигал значений контрольной группы. Можно предположить, что растительные экстракты участвуют в регуляции работы транскрипционных факторов, контролирующей экспрессию различных генов. В частности, Li и соавт. показали, что фракции чёрной малины ингибировали активацию AP-1, NF- κ B и ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT) с помощью BaPDE, а также их восходящих PI-3K/Akt-p70 (S6K) и митоген-активируемых протеинкиназных путей [33].

Полученные данные свидетельствуют, что увеличение активности МЭ связано с повышением скорости транскрипции кодирующих их генов. При этом пероральное применение растительных экстрактов нивелирует изменение транскрипционной активности генов *me-1*, *me-2* и *me-3* и, как следствие, приводит к снижению скорости функционирования МЭ, не достигая при этом контрольных значений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Увеличение активности NAD^+ - и NADP^+ -МЭ в печени крыс в условиях аллоксанового диабета наблюдается в результате увеличения скорости транскрипции генов *me-1*, *me-2* и *me-3* и может быть связано с необходимостью синтеза дополнительных молекул пирувата и NADPH в условиях стресса.

Исследуемые растительные экстракты обладают гипогликемическим действием, проявляющимся в заметном снижении концентрации глюкозы в крови крыс при аллоксановом диабете, нивелируют изменение транскрипционной активности исследуемых генов и, как следствие, приводят к нормализации биохимических процессов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят компанию “Евроген” за синтез используемых в исследовании олигонуклеотидов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ проекта № 20-04-00296.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры эксперимента соответствовали требованиям международных правил гуманного отношения к животным, отражённых в санитарных правилах по отбору и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lehrke M., Marx N.* (2017) Diabetes mellitus and heart failure. *Am. J. Cardiol.*, **120**(1S), S37-S47. DOI: 10.1016/j.amjcard.2017.05.014
2. *Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J.* (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39**(1), 44-84. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001
3. *Yen W.C., Wu Y.H., Wu C.C., Lin H.R., Stern A., Chen S.H., Shu J.-Ch., Chiu D.T.-Y.* (2020) Impaired inflammasome activation and bacterial clearance in G6PD deficiency due to defective NOX/p38 MAPK/AP-1 redox signaling. *Redox. Biol.*, **28**, 101363. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101363
4. *Goodman R.P., Calvo S.E., Mootha V.K.* (2018) Spatiotemporal compartmentalization of hepatic NADH and NADPH metabolism. *J. Biol. Chem.* **293**(20), 7508-7516. DOI: 10.1074/jbc.TM117.000258
5. *Balunas M.J., Kinghorn A.D.* (2005) Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.*, **78**, 431-441. DOI: 10.1016/j.lfs.2005.09.012
6. *Ahn H.Y., Kim M., Seo C.R., Yoo H.J., Lee S.H., Lee J.H.* (2018) The effects of Jerusalem artichoke and fermented soybean powder mixture supplementation on blood glucose and oxidative stress in subjects with prediabetes or newly diagnosed type 2 diabetes. *Nutr. Diabetes*, **8**, 42. DOI: 10.1038/s41387-018-0052-y
7. *Pourghassem G.B., Dehghan P., Aliasgharzadeh A., Asghari J.M.* (2013) Effects of high performance inulin supplementation on glycemic control and antioxidant status in women with type 2 diabetes. *Diabetes Metab. J.*, **37**, 140-148. DOI: 10.4093/dmj.2013.37.2.140
8. *Nediani Ch., Ruzzolini J., Romani A., Calorini L.* (2019) Oleuropein, a bioactive compound from *Olea europaea* L., as a potential preventive and therapeutic agent in non-communicable diseases. *Antioxidants (Basel)*, **8**(12), 578. DOI: 10.3390/antiox8120578
9. *Lenzen S.* (2008) The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, **51**(2), 216-226. DOI: 10.1007/s00125-007-0886-7
10. *Аль Дайни С.* (2012) Влияние водного экстракта Оливы европейской (*Olea europaea*) на функционирование ферментов гликоксилатного цикла у крыс в условиях экспериментального диабета. Автореферат дис. кандидата биологических наук, Воронеж. гос. ун-т,

- Воронеж. [Al' Dajni S. (2012) Vliyanie vodnogo ekstrakta Olivu evropejskoj (*Olea europaea*) na funkcionirovanie fermentov glioksilatnogo cikla u kryss v usloviyah eksperimental'nogo diabeta. Avtoreferat dis. kandidata biologicheskikh nauk, Voronezh. gos. un-t, Voronezh.]
11. Davis B.J. (1964) Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins, Ann. NY Acad. Sci., **121**, 404-427. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1964.tb14213.x
 12. Остерман Л.А. (1981) Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука. 288 с. [Osterman L.A. (1981) Metody issledovaniya belkov i nukleinovyykh kislot: elektroforez i ul'tracentrifugirovanie. M.: Nauka. 288 p.]
 13. Toni L.S., Garcia A.M., Jeffrey D.A., Jiang X., Stauffer B.L., Miyamoto Sh.D., Sucharov C.C. (2018) Optimization of phenol-chloroform RNA extraction. MethodsX, **5**, 599-608. DOI: 10.1016/j.mex.2018.05.011. eCollection 2018.
 14. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden Th.L. (2012) Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics, **13**(1), 134. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134
 15. Retrieved November 10, 2022, from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genes/>
 16. Retrieved November 10, 2022, from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
 17. Sievers F., Higgins D.G. (2014) Clustal omega. Curr. Protoc. Bioinform., **48**(3.13), 1-16. DOI: 10.1002/0471250953.bi0313s48
 18. Dhanasekaran S., Doherty T.M., Kenneth J. (2010) Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. J. Immunol. Methods, **354**, 34-39. DOI: 10.1016/j.jim.2010.01.004
 19. Muhtadi, Primarianti A.U., Sujono T.A. (2015) Antidiabetic activity of durian (*Durio zibethinus* Murr.) and rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) fruit peels in alloxan diabetic rats. Proc. Food Sci., **3**, 255-261. DOI: 10.1016/j.profoo.2015.01.028
 20. Епринцев А.Т., Селиванова Н.В., Моисеенко А.В. (2021) Влияние экстракта топинамбура на функционирование малатдегидрогеназы в печени крыс при аллоксановом диабете. Биомедицинская химия, **67**(2), 144-149. [Eprintsev A.T., Selivanova N.V., Moiseenko A.V. (2021) Effect of jerusalem artichoke extract on the functioning of malate dehydrogenase in the liver of rats with alloxan diabetes. Biomeditsinskaya Khimiya, **67**(2), 144-149.] DOI: 10.18097/PBMC20216702144
 21. Толкачева В.В., Кичигина Т.М., Кобалава Ж.Д. (2009) Современные антигипергликемические препараты: механизмы действия и клинические эффекты. Клиническая фармакология и терапия, **18**(2), 75-82. [Tolkacheva V.V., Kichigina T.M., Kobalava Zh.D. (2009) Sovremennye antigiperglikemicheskie preparaty: mekhanizmy dejstva i klinicheskie efekty. Klinicheskaya Farmakologiya i Terapiya, **18**(2), 75-82.]
 22. Omar S.H. (2010) Oleuropein in olive and its pharmacological effects. Sci. Pharm., **78**, 133-154. DOI: 10.3797/scipharm.0912-18
 23. Pourkhodad S., Alirezaei M., Moghaddasi M., Ahmadvand H., Karami M., Delfan B., Khanipour Z. (2016) Neuroprotective effects of oleuropein against cognitive dysfunction induced by colchicine in hippocampal CA1 area in rats. J. Physiol. Sci., **66**, 397-405. DOI: 10.1007/s12576-016-0437-4
 24. Al-Azzawie H.F., Alhamdani M.S. (2006) Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. Life Sci., **78**, 1371-1377. DOI: 10.1016/j.lfs.2005.07.029
 25. Xu J., Han J., Long Y.S., Lock J., Weir G.C., Epstein P.N., Liu Y.Q. (2008) Malic enzyme is present in mouse islets and modulates insulin secretion. Diabetologia, **51**, 2281-2289. DOI: 10.1007/s00125-008-1155-0
 26. Hasan N.M., Longacre M.J., Stoker S.W., Kendrick M.A., MacDonald M.J. (2015) Mitochondrial malic enzyme 3 is important for insulin secretion in pancreatic β -cells. Mol. Endocrinol., **29**(3), 396-410. DOI: 10.1210/me.2014-1249
 27. Епринцев А.Т., Бондарева И.Р., Селиванова Н.В. (2022) Уровни экспрессии и активность изоферментов лактатдегидрогеназы печени крыс при аллоксановом диабете. Биомедицинская химия, **68**(1), 32-38. [Eprintsev A.T., Bondareva I.R., Selivanova N.V. (2022) Expression levels and activity of rat liver lactate dehydrogenase isoenzymes in alloxan diabetes. Biomeditsinskaya Khimiya, **68**(1), 32-38.] DOI: 10.18097/PBMC20226801032
 28. Савченко А.А., Крюкова Е.В., Манчук В.Т., Панфилова В.Н. (2000) Особенности активности NAD(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов крови у детей и подростков с инсулинзависимым сахарным диабетом. Сибирский медицинский журнал (Иркутск), **2**(1), 27-30. [Savchenko A.A., Kryukova E.V., Manchuk V.T., Panfilova V.N. (2000) Osobennosti aktivnosti NAD(F)-zavisimyyh degidrogenaz limfocitov krvi u detej i podrostkov s insulinzavisimym saharnym diabetom. Sibirskij Medicinskij Zhurnal (Irkutsk), **2**(1), 27-30.]
 29. Garcia-Jiménez C., Benito B., Jolin T., Santisteban P. (1994) Insulin regulation of malic enzyme gene expression in rat liver: Evidence for nuclear proteins that bind to two putative insulin response elements. Mol. Endocrinol., **8**(10), 1361-1369. DOI: 10.1210/mend.8.10.7854353
 30. Drake R.L., Parks W.C., Thompson E.W. (1983) Insulin stimulation of hepatic malic enzyme activity in normal and diabetic rats controlled by different regulatory processes. J. Biol. Chem., **258**(10), 6008-6010.
 31. Retrieved November 10, 2022, from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=malic+enzyme>
 32. Rui L. (2014) Energy metabolism in the liver. Compr. Physiol., **4**(1), 177-197. DOI: 10.1002/cphy.c130024.
 33. Li J., Zhang D., Stoner G.D., Huang Ch. (2008) Differential effects of black raspberry and strawberry extracts on BaPDE-induced activation of transcription factors and their target genes. Mol. Carcinog., **47**(4), 286-294. DOI: 10.1002/mc.20377.

Поступила в редакцию: 10. 10. 2022.
 После доработки: 09. 02. 2023.
 Принята к печати: 28. 02. 2023.

**THE EFFECT OF PHYTOPROTECTORS ON THE FUNCTIONING
OF LIVER NAD⁺- AND NADP⁺-MALIC ENZYMES IN RATS WITH ALLOXAN DIABETES**

A.T. Eprintsev, N.V. Selivanova*

Voronezh State University,
1 Universitetskaya sq., Voronezh, 394018 Russia; *e-mail: bc366@bio.vsu.ru

The development of experimental alloxan diabetes in rats was accompanied by the increase the activity of liver NAD⁺- and NADP⁺-dependent malic enzymes (ME; NAD⁺-ME, EC 1.1.1.39 and NADP⁺-ME, 1.1.1.40) associated with an increase in the rate of transcription of genes encoding these enzymes. Oral administration of aqueous extracts of Jerusalem artichoke and olive to diabetic rats caused a noticeable decrease in blood glucose, a decrease in the rate of transcription of the studied genes; and a decrease in ME activity towards normal values. Thus, extracts of Jerusalem artichoke and olive can be used as additives to the standard therapy of diabetes mellitus.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: malic enzyme; decarboxylating malate dehydrogenase; diabetes; alloxan; activity; expression; gene; isoenzyme; phytoprotector

Funding. The study was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (project No. 20-04-00296).

Received: 10.10.2022; revised: 09.02.2023; accepted: 28.02.2023.