

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ БИОМЕМБРАН ПРИ ОСЛОЖНЕНИЯХ САХАРНОГО ДИАБЕТА И ИХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ.

Л.В.ТАТЬЯНЕНКО*, Г.Н.БОГДАНОВ*, В.Н.ВАРФОЛОМЕЕВ*,
Р.А.КОТЕЛЬНИКОВА*, Г. И. ШАПОШНИКОВА**Л.Д. СМИРНОВ**

*Институт химической физики РАН, Черноголовка,

**Всероссийский научный центр биологически активных веществ, Купавна.

На примере созданной нами экспериментальной модели диабетических ангиопатий, возникающих у животных при атерогенной диете и введение L-адреналина, показано увеличение активности альдозоредуктазы (АР) и снижение функции сорбитолдегидрогеназы (СДГ), а также накопление сорбитола в хрусталиках глаз и аорте экспериментальных животных. Методом спиновых и люминесцентных зондов выявлены значительные структурно-функциональные изменения мембран эритроцитов при ангиопатиях, что подтверждает гипотезу о ведущей роли процессов мембранной патологии в патогенезе диабетических ангиопатий. Фармакологическая коррекция глюкофагом (известным противодиабетическим препаратом) и новым биоантиоксидантом ЛБК-78 нормализует функцию ферментов (АР, СДГ, цитохрома Р450), накопление сорбитола, а также структурно-функциональные характеристики эритроцитарных мембран.

Ключевые слова: диабетические ангиопатий, сорбитоловый путь обмена глюкозы, структура и функции биомембран.

ВВЕДЕНИЕ. Осложнения сахарного диабета - диабетические ангиопатии - сопровождаются нарушением метаболических функций различных в образовании органов и тканей, что выражается в развитии нефропатии, нейропатии, катаракты и др. [1,2].

Известно также, что при сахарном диабете, помимо декомпенсации углеводного обмена, повышается уровень холестерина, общих липидов и липопротеидов низкой плотности при снижении уровня липопротеидов высокой плотности [3]. Эти нарушения липидного обмена позволяют предположить, что патогенетические процессы возникновения осложнений сахарного диабета сопряжены с нарушениями структуры и функции биологических мембран. При этом изменяется активность мембраносвязанных ферментов, в частности, цитохрома Р450, дисфункция которого отмечена в почках и в печени при сахарном диабете [4].

Структурно-функциональные изменения мембранного аппарата клеток различных органов и тканей при диабетических ангиопатиях объясняются накоплением сорбитола, что является одним из показателей нарушения сорбитолового пути утилизации глюкозы [5]. При этом повышается активность альдозоредуктазы (АР) и снижается функция сорбитолдегидрогеназы (СДГ) - ключевых ферментов сорбитолового пути метаболизма глюкозы. Вследствие этого ингибиторы АР могут предотвращать появление вышеуказанных патологий [6,7].

Ранее нами было показано, что большинство известных биоантиоксидантов различного спектра действия ингибируют функцию АР из хрусталика глаза [8].

Молекулярные механизмы их действия могут быть связаны как с возможным участием кофермента АР в побочных реакциях переноса электронов на кислород, так и с изменением характеристик, определяющих антиоксидантный статус организма [3]. На моделях экспериментальной диабетической ангиопатии у животных, подтверждающей гормонально-метаболическую гипотезу возникновения осложнений сахарного диабета, показано, что антиоксидант пробукол снижает активность АР и накопление сорбитола в стенках сосудов экспериментальных крыс [3].

Целью настоящей работы является исследование процессов мембранной патологии в различных органах и тканях при диабетических ангиопатиях и влияние на них биологически активных веществ, эффективно влияющих на сорбитоловый путь обмена глюкозы и обладающих мембранопротекторными свойствами.

МЕТОДИКА. Диабетические ангиопатии у беспородных крыс - самцов массой 200-250 г. вызывали путем их содержания в течение 4-х месяцев на атерогенном рационе, включавшем 10 % холестерина (из расчета 0,5 г холестерина на 1 кг веса) и 1% холевой кислоты в масляной суспензии. После этого в течение 7 суток проводили внутривенные инъекции L-адреналина в дозе 0,25 мг/кг.

Индукцированные диабетические ангиопатии характеризовали различными биохимическими показателями липидного обмена в сыворотке крови, в печени, почках и стенке аорты, а также морфологическими и электронномикроскопическими методами в процессе формирования экспериментального сахарного диабета [3]. Исследования форменных элементов крови и отдельных органов и тканей экспериментальных животных проводили после декапитации с предварительным 18-часовым голоданием.

В качестве препаратов, влияющих на развитие диабетических ангиопатий, использовали глюкофаг или препарат ЛБК-78, который вводили однократно интраперитонеально в дозе 50 мг/кг (в/бр). Контрольным животным вводили физиологический раствор. Животных декапитировали через 7 дней.

АР выделяли из хрусталиков глаз и аорт нормальных животных и с экспериментальным сахарным диабетом, и активность АР определяли спектрофотометрическим методом [5]. СДГ выделяли из органов крыс по методу [9], и активность фермента определяли спектрофотометрически [6]. Количество сорбитола в стенках аорты и хрусталиках глаз определяли по методу [7].

Метаболическую активность тканей печени и почек определяли методом ЭПР по содержанию парамагнитных центров коферментов, участвующих в процессах детоксикации ксенобиотиков (цитохром Р450) и биоэнергетике клеток (флаво- и убисемихиноны и железо-серные центры митохондрий). Содержание низкоспиновой окисленной формы цитохрома Р450, флаво- и убисемихинов, а также Fe-S центров в замороженных образцах печени и почек различных групп животных определяли по интенсивности сигналов ЭПР с $d=2,25$, $d=2,00$ и $d=1,94$, соответственно [10].

О структурно-функциональных изменениях в биологических мембранах судили по изменениям, происходящим в мембранах методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), а также методом люминесцентных зондов [11,12,13].

Функциональные изменения в мембранах эритроцитов характеризовали по скорости восстановления нитроксильного радикала. К 100 мкл суспензии эритроцитов добавляли 1,0 мкл метил-малеимид-ТЕМПО в концентрации 10^{-2} М и равное количество цитрата натрия, рН = 6,8. Спектры ЭПР регистрировали на радиоспектрофотометре "Varian E-104". Скорость восстановления нитроксила отражает уровень электрон-транспортных цепей в мембранах эритроцитов.

Из сыворотки крови крыс путем центрифугирования в цитратном буфере, рН 6,8 получали эритроцитарную массу ($d=5,4$ тыс. об/мин, 5 мин, многократно). Из этой массы отбирали 0,2 мл, и в кювете доводили объем пробы до 2,0 мл нитратным буфером, после чего добавляли 0,02 мл водного раствора эритрозина в концентрации $2,3 \times 10^{-3}$ М. Молекулы зонда возбуждали импульсным азотным

лазером ($\lambda_{\text{возб}} - 337 \text{ нм}$). Кинетику затухания фосфоресценции эритрозина измеряли на импульсной лазерной установке на основе регистратора переходных процессов DL-912 [12].

Перед регистрацией люминесценции из приготовленных образцов ферментативно удаляли кислород, добавляя в пробу 1 мг глюкозы (Sigma), 100 мкг глюкозооксидазы (Sigma) и 100 мкг каталазы. Регистрация излучения образца осуществлялась с помощью фотоумножителя через красный светофильтр КС-13. Регистрировали кривую затухания фосфоресценции эритрозина и в экспоненциальном приближении определяли время жизни возбужденных молекул эритрозина ($\tau_{\text{фосф}}$).

Для исследования структуры гидрофобных областей мембран исследовалась замедленная аннигиляционная флуоресценция пирена. Для этого к эритроцитарной массе добавляли 0,2 мл раствора пирена в 3% спирте в концентрации 10^{-3} М . Измерения проводили на импульсной лазерной установке с использованием светофильтра ЖС-10 [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В работе исследовалась функция альдозоредуктазы (АР), сорбитолдегидрогеназы (СДГ) и накопление сорбитола в хрусталиках (Х) глаз и аортах (А) крыс нормальных животных и с экспериментальным сахарным диабетом.

Учитывая патологические изменения, наблюдаемые при диабетических ангиопатиях на молекулярном уровне, мы предприняли попытки коррекции процесса осложнений сахарного диабета известным антидиабетическим препаратом глюкофагом, а также новым химическим соединением - ЛБК-78, обладающим биоантиоксидантным действием и вызывающим в опытах *in vitro* конкурентное, частично обратимое ингибирование функции АР. Результаты исследования представлены в табл. 1,2.

Как видно из таблиц 1, 2, у животных с экспериментальным сахарным диабетом статистически достоверно повышена активность АР на $(61 \pm 7)\%$ и $(47 \pm 4)\%$ в хрусталике глаза и аорте, соответственно. При этом снижена активность СДГ на $(43 \pm 4)\%$ и $(24 \pm 3)\%$, соответственно.

Таблица 1. Активность АР, СДГ и накопление сорбитола в хрусталике крыс в норме и при экспериментальном сахарном диабете.

Измеряемый показатель	Удельная активность АР в нмолях NADH на мг белка в мин.	Удельная активность СДГ в нмолях NAD на мг белка в мин.	Концентрация сорбитола в мкмоль на грамм ткани
Контроль	$1,8 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,1$	$7,04 \pm 1,5$
Животные с диабетическими ангиопатиями	$2,9 \pm 0,2$ $+61 \pm 7\%$	$0,8 \pm 0,03$ $-43 \pm 4\%$	$30 \pm 3,0$
Лечение глюкофагом	$1,7 \pm 0,2$ $-5,5\%$	$1,0 \pm 0,1$ $-28 \pm 3 \%$	$9,0 \pm 1,0$
Лечение ЛБК-78	$1,0 \pm 0,1$ $-44 \pm 4\%$	$1,2 \pm 0,2$ $-14 \pm 1\%$	$7,0 \pm 0,5$

Даны среднеквадратические ошибки результатов 8-10 опытов на животных. В скобках указаны %% активации (+) или ингибирования (-) функции ферментов относительно нормы.

Нормирование всех изученных показателей позволяет представить их на векторной диаграмме (рис. 1). На каждом из векторов отложены нормированные значения соответствующих показателей (АР, СДГ и содержание сорбитола) в хрусталике глаза и аорте крыс в норме и при ангиопатиях. Соединение этих точек образует два контура, один из которых в виде правильного шестиугольника соответствует норме, а другой - изученной патологии.

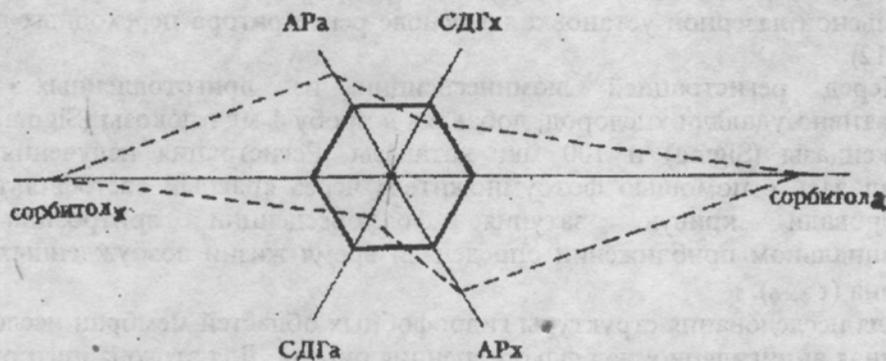


Рисунок 1.

Векторная диаграмма изменений показателей сорбитолового пути метаболизма глюкозы в хрусталике глаза (х) и аорте (а) крыс в норме и при диабетических ангиопатиях.

Как видно из рис. 1, у диабетических животных содержание сорбитола в хрусталике глаза увеличивается в четыре раза, а в аорте в пять раз по сравнению с нормой. Многократное увеличение концентрации сорбитола по сравнению с нормой, несоизмеримое с изменениями функции ферментов, связано с накоплением сорбитола во времени. Введение животным глюкофага приводит к нормализации функции АР в случае ЛБК-78 к значительному снижению активности АР в хрусталике по сравнению с нормой. Активность СДГ также приближается к показателям функции этого фермента у контрольных крыс (табл. 1,2).

Таблица 2. Активность АР, СДГ и накопление сорбитола в аорте крыс в норме и при экспериментальном сахарном диабете.

Группа животных	Удельная активность АР в нмолях NADPH на мг белка в мин.	Удельная активность СДГ в нмолях NAD на мг белка в мин.	Содержание сорбитола мкмоль на грамм ткани
Контроль	38±0,3	10,0±1,0	16,0±2,0
Животные с диабетическими ангиопатиями	56±5 +47±4%	7,6±0,7 -24±3%	83±6
Лечение глюкофагом	41±9 -7,8%	9,1±0,5 -9%	49,0±2
Лечение ЛБК-78	39±4,0 +3%	9,8±1,0 -2%	35,0±0,3

Даны среднеквадратические ошибки результатов 8-10 опытов на животных. В скобках указаны %% активации (+) или ингибирования (-) функции ферментов относительно нормы.

Ингибирование активности АР глюкофагом и активация функции СДГ этим препаратом приводит к снижению содержания сорбитола в хрусталике в три раза, а в аорте, примерно, в полтора раза по отношению к животным с диабетическими ангиопатиями. Такое влияние на АР и СДГ соединения ЛБК-78 приводит к значительному уменьшению содержания сорбитола в хрусталике и аорте.

Сравнительное исследование действия глюкофага и нового биоантиоксиданта ЛБК-78 показало, что действие последнего на снижение концентрации сорбитола в хрусталике глаза и аорте примерно, в 1,5-2 раза больше, чем действие известного лекарственного препарата - глюкофага. В целом, полученные данные, как мы полагаем, свидетельствуют о более выраженном действии антиоксиданта ЛБК-78 на активность АР, СДГ, а также на снижение концентрации сорбитола в тканях животных. Высокая активность, специфичность,

частичная обратимость действия препарата ЛБК-78 предопределяет возможную перспективность этого соединения в качестве нового лекарственного средства для лечения осложнений сахарного диабета.

Следующим этапом исследования явилось выявление дисфункции печени и почек экспериментальных животных.

Функциональная роль цитохрома P450, относящегося к системе неспецифических многоцелевых оксидаз, связывается главным образом с его участием в метаболических процессах, обеспечивающих детоксикацию ксенобиотиков. Окисленная (активная) форма этого фермента, парамагнитна, что позволяет регистрировать ее методом ЭПР при температуре жидкого азота не только в изолированных микросомах, но и в клетках к целых тканях по сигналу с $g=2,25$. Электронпереносящие железо-серные кластеры митохондрий дают сигнал ЭПР с $g=1,94$. При низких значениях микроволновой мощности, падающей на образец, регистрируется суперпозиция сигналов флаво- и убисемихинонов в электрон-транспортной цепи митохондрий при $g=2,00$ [10]. Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Исследование функциональной активности ткани почек крыс

g-фактор Группа животных	2,25	2,0	1,94
	Цитохром P450	Флаво и убисемихиноны	Железо-серные кластеры
Нормальные крысы	7,4±1,0*	14,2±2,0*	20,4±2*
Крысы с диабетическими ангиопатиями	4,2±0,5	13,0±2,0	18,6±2,0
Леченые глюкозагом	7,6±1,0*	14,0±2,0*	20,4±2*
Леченые ЛБК-78	7,4±0,7*	14,8±1,0*	20,8±2,0*

Даны среднеквадратичные ошибки результатов 4-5 опытов. Знаком * отмечены достоверные различия по отношению к животным с ангиопатиями.

Приведенные в таблице 3, результаты показывают, что при экспериментальном сахарном диабете у крыс, вызванном атерогенной нагрузкой в сочетании с L-адреналином, функциональная активность почечной ткани снижается. Терапия глюкозагом и ЛБК-78 нормализует метаболические процессы в почках по всем изученным параметрам (табл.3).

Аналогичные данные были получены при исследовании функциональной деятельности печени крыс с диабетическими ангиопатиями, а также леченых препаратами - ЛБК-78 и глюкозагом. Полученные данные согласуются с результатами работы [4], показывающей разный уровень цитохрома P450 у нормальных и диабетизированных крыс, а также при действии на этот процесс различных биологически активных веществ и инсулина [4].

Известно, что сахарный диабет и его осложнения вызывают изменения в эритроцитах крови больных животных. Можно полагать, что функциональное состояние эритроцитов при сахарном диабете связано со структурными изменениями их мембран и является отражением структурно-функциональных изменений в стенках сосудов различных органов и тканей животных, что выявлено при морфологических и электронномикроскопических исследованиях [3].

Методом ЭПР были проведены исследования, связанные с выявлением функциональных изменений в мембранах эритроцитов нормальных, диабетизированных и леченых глюкозагом или ЛБК-78 животных.

Структурно-функциональные отклонения в процессах мембранной патологии изучали на примере мембран эритроцитов, полученных из крови крыс с диабетическими ангиопатиями.

О функциональной активности электрон-транспортных цепей (ЭТЦ) эритроцитарных мембран судили по скорости восстановления нитроксильной метки

(малеимид-ТЕМРО), регистрируемой методом ЭПР. Известно, что в системах *in vivo* нитроксильные радикалы восстанавливаются, главным образом, либо в реакциях с SH-содержащими соединениями, либо путем переноса электрона с ЭТЦ на нитроксильную группировку на участке, блокируемом ротеноном [11].

Применяя в данной работе малеимид-ТЕМРО, мы исходили из того, что все доступные SH-группы связываются малеимидным фрагментом, и поэтому восстановление нитроксила осуществляется только за счет ЭТЦ эритроцитарных мембран.

Кинетические кривые изменения интенсивности центральной линии резонансного поглощения в спектре ЭПР нитроксильного радикала приведены на рис. 2.

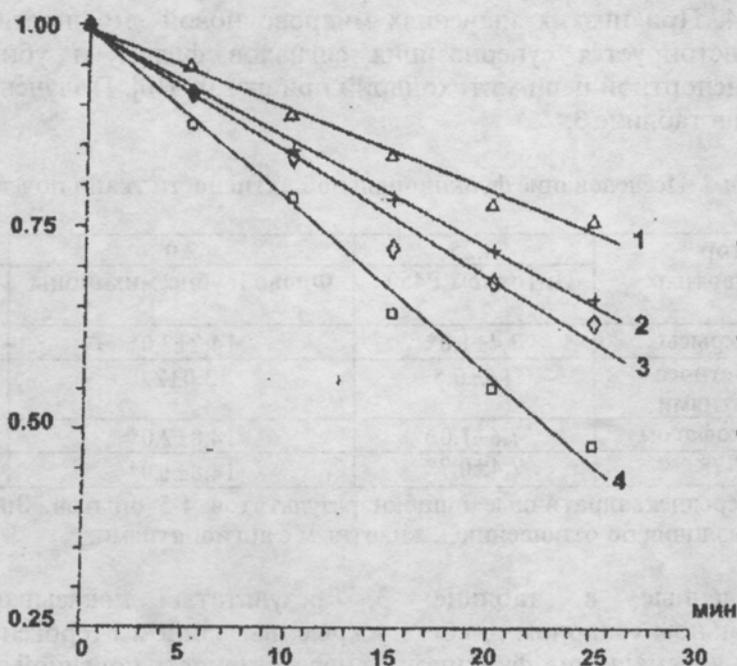


Рисунок 2.

Кинетика восстановления нитроксильного радикала в мембранах эритроцитов крови крыс в норме (1), при диабетических ангиопатиях (4) и при лечении их глюкофагом (2) и ЛБК-78 (3). По оси абсцисс - время, мин По оси ординат - нормированная величина концентрации нитроксильного радикала

Как видно из рис. 2, при экспериментальном сахарном диабете, вызванном атерогенной нагрузкой + L-адреналин, снижается скорость восстановления нитроксила в мембранах эритроцитов почти вдвое. Так, в норме константа скорости восстановленного нитроксила в мембранах эритроцитов составляет $k=0,021$ спин/мин, при диабетических ангиопатиях $k=0,010$ спин/мин. При введении диабетизированному животному глюкофага или ЛБК-78 эти значения составляют $k=0,015$ спин/мин и $0,013$ спин/мин, соответственно.

Структурные изменения в мембранах эритроцитов при диабетических ангиопатиях изучали методом люминесцентных зондов.

Как видно из таблицы 4, время жизни возбужденных молекул эритрозина в эритроцитах при диабетических ангиопатиях несколько ниже, чем в норме. Это факт указывает на увеличение полярности поверхностных гидрофильных участков эритроцитарных мембран, где локализуются молекулы эритрозина. Под влиянием глюкофага или ЛБК-78 происходит, вероятно, структурная перестройка мембраны, так что полярность ее поверхности снижается, на что и указывает увеличение времени жизни люминесцентного зонда. Иными особенностями характеризуются

внутренние гидрофобные домены эритроцитарных мембран, где располагаются молекулы пирена. При диабетических ангиопатиях время жизни возбужденных молекул пирена значительно уменьшается. В связи с этим следует отметить, что именно в гидрофобных доменах липидного матрикса мембран протекают процессы перекисного окисления липидов с образованием высокополярных продуктов окисления, которые могут быть тушителями замедленной аннигиляционной флуоресценции пирена. Возможно, по этой причине наблюдаемое при диабете в эритроцитарных мембранах снижение времени жизни возбужденных состояний пирена не поддается фармакологической коррекции глюкофаром или ЛБК-78.

Таблица 4 Время жизни возбужденных (мксек) состояний эритрозина и пирена в мембранах эритроцитов

Образец Зонд	Нормальные эритроциты	Эритроциты при диабетических ангиопатиях	Действие глюкофага на эритроциты при диабетических ангиопатиях	Действие ЛБК-78 на эритроциты при диабетических ангиопатиях
Эритрозин	8,5±0,3	7,5±0,2	9,0±0,3	10,0±0,3
Пирен	10,0±0,3	7,5±0,2	7,9±0,3	7,5±0,2

Полученные нами результаты подтверждают справедливость гипотезы о ведущей роли мембранной патологии в патогенезе диабетических ангиопатий, которая включает в себя генерацию свободнорадикальных интермедиатов восстановления молекулярного кислорода, активацию перекисного окисления липидов, изменение антиоксидантного статуса клеток и структурно-функциональные изменения в мембранах различных органов и тканей. Полученные экспериментальные данные открывают пути создания научных основ лечения и предотвращения развития осложнений сахарного диабета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kinoshita J.H. Fukushi S., Kador P. et all. (1979) *Metabolism* 28, S.I, 462-469.
2. Fukushi S., Merula L.O., Kinoshita J.H., et all. (1980) *Invest Oph-balmol.- Vis. Sci.* 19, 313-315.
3. Татьянаенко Л.В., Шапошникова Г.И., Гулевская Т.Г., Смирнов Л.Д. (1998) *Вопросы мед. химии*, 44,55-62.
4. Qianq Ma, Ghasi A.Dannan, F.Peter, Chung S.Yang (1989) *Biochem. Pharmacol.* 8, 3179-3184.
5. Haymen S, Kinoshita J.H. (1965) *J.Biol. Chem.* 240, 877-882.
6. Jedziniak J.A., Chylack L.T., Chyeng H.M. et all. (1981) *Invest Ophtalmol. Vis. Sci.* 20, 314-326.
7. Bergmeyer H.V., Gruber W., Gutaman J. (1974) In.:Bergmeyer H.V. (ed) N.Y.-Academic Press., 1323-1326.
8. Татьянаенко Л.В., Богданов Г.Н., Варфоломеев В.Н., Котельникова Р.А., Смирнов Л.Д. (1996) *Хим.-фарм. журнал.* 30, № 6, 9-10.
9. Smith M.J. (1962) *Biochem. J.* 83, 135-144.
10. Варфоломеев В.Н., Богданов Г.Н., В.В.Дьякова, В.М.Павлова, Н.М.Эмануэль (1976) *Биофизика.* 21, 5, 881-886.

11. *Жданов Р.И.* (1981) Парамагнитные модели биологически активных соединений. М. Наука.
12. *Котельникова Р. А., Татьянаенко Л.В., Меклер В. М., Котельников А. И.* (1982) Мол. биология. 16, № 6. 265-276.
13. *Меклер В. М., Котельников А. И., Лихтенштейн Г.И.* (1983) Биофизика. 28, № 3, 503-504.

STRUCTURE-FUNCTIONAL ALTERATIONS IN BIOMEMBRANES AT DIABETIC COMPLICATIONS AND THEIR PHARMACOLOGICAL CORRECTIONS.

L.V. TATYANENKO*, G.N. BOGDANOV*, V.N. VARFOLOMEEV*, R.A. KOTELNIKOV*,
G. I. SHAPOSHNIKOVA**, L. D. SMIRNOV**.

* Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka

** Russian Research Center for Security of Biologically Active compounds, Kupavna.

The decrease of sorbitol dehydrogenase activity and the increase both of aldose reductase activity and sorbitol concentration in aorta or eye lens under experimental diabetic angiopathy have been shown. The structural and functional alterations in erythrocytes membranes under angiopathy studied by spin- and luminescence probes confirm the hypothesis on the major role of membrane pathology processes in the pathogenesis of diabetic mellitus. Pharmacological correction of diabetic angiopathy by glucophag or new antioxidant LBK-78 normalized the studied diversions on the membranes level.

Key words: diabetic angiopathy, sorbitol pathway of glucose metabolism, structure and functions of biomembranes.