

577.151.042: 577.25/616.379-008.64

© Коллектив авторов

### АКТИВНОСТЬ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ПЕЧЕНИ И МОЗГЕ СНИЖАЕТСЯ В РАННИЕ СРОКИ ДИАБЕТА, И ЭТО СНИЖЕНИЕ ЗАВИСИТ ОТ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ

Е.А. КОСЕНКО<sup>1</sup>, А.Ю. КАМИНСКИЙ<sup>2</sup>, Ю.Г. КАМИНСКИЙ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия 142292; ФАКС (0967) 790553; E-mail: kaminsky@trik.itb.serpukhov.su

<sup>2</sup>МГУ им. М.В.Ломоносова, Физический факультет, Москва, Россия 117234

Показано, что активность каталазы, супероксиддисмутазы, глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в цитоплазматических фракциях печени и мозга снижается на 6-й день аллоксанового диабета у крыс. Вводимый предварительно препарат МК-801 препятствует этому снижению активности. Изменения в антиокислительных ферментах могут оказаться первичными биохимическими нарушениями в печени и в мозге при развитии диабета, а в молекулярном механизме этих нарушений участвуют глутаматные NMDA-рецепторы.

**Ключевые слова:** диабет, ферменты-антиоксиданты, печень, мозг, NMDA-рецепторы

**ВВЕДЕНИЕ.** Диабет - пожалуй, наиболее распространенная болезнь человека, не поддающаяся полному излечению и уносящая ежегодно жизни от одного до трёх миллионов человек на нашей планете. Несмотря на то, что признаки этой болезни известны уже почти четыре тысячи лет, а самому термину «диабет» почти две тысячи лет и что усиленное внимание медиков и биологов к заболеванию проявляется на протяжении всего XX века, механизм его развития, а потому и способ лечения остаются невыясненными [1].

Диабет обычно рассматривается как тяжелое метаболическое заболевание, связанное с нарушением всех видов обмена и, прежде всего углеводного обмена. Ведущая роль в этом нарушении принадлежит клеткам печени, производящим огромный избыток глюкозы, и  $\beta$ -клеткам поджелудочной железы, синтезирующим инсулин, повреждение которых в конечном итоге приводит к постепенным изменениям во всех метаболических и транспортных процессах, участвующих в обмене глюкозы в организме. Нарушаются также функции центральной нервной системы [2-4].

При диабете развивается окислительный стресс, вызываемый свободными кислородными радикалами. У больных диабетом резко ухудшаются антиокислительные свойства крови [5, 6]; при экспериментальном диабете снижается активность ферментов антиокислительной защиты в мозге крыс и мышей [7, 8], повышается концентрация перекисей липидов в мозге, печени, почках и крови [8-10].

У крыс нейрологические проявления диабета возникают после введения стрептозотоцина и включают нарушение в глутаматергической нейротрансмиссии [11]. Роль глутаматных NMDA-рецепторов в развитии диабета и диабетического окислительного стресса изучена недостаточно. В литературе основная часть работ выполнена на третьей-четвертой неделях экспериментального диабета. Более ранние сроки развития болезни остаются слабо охарактеризованными биохимически.

В данной работе описываются изменения в антиокислительных ферментах печени и мозга крыс на шестой день аллоксанового диабета и влияние вводимого животным препарата МК-801 - специфического блокатора глутаматных NMDA-рецепторов - на активность этих ферментов.

**МЕТОДИКА.** Эксперименты выполняли на взрослых крысах Вистар, самцах массой 220-250 г, разделенных на 4 группы. Животным двух групп вводили внутривенно аллоксан в однократной дозе 200 мг на 1 кг массы тела. Затем половине из них дополнительно вводили ежедневно, начиная со второго дня, препарат МК-801 в однократной суточной дозе 2 мг/кг в течение трех дней. Крысам третьей группы вводили только МК-801, а контрольным - однократно физраствор.

Животных забивали декапитацией через два дня после последнего введения, (то-есть на шестой день развития диабета у получавших аллоксан крыс). Часть крыс забивали на двадцать первый день после введения аллоксана. Кровь отбирали гепаринизированной пипеткой и отделяли эритроциты от плазмы. Печень и передний мозг быстро удаляли; из тканей готовили цитоплазматические фракции; в этих фракциях и эритроцитах определяли активность каталазы, супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, малоновый диальдегид (МДА), а также глюкозу в цельной крови методами, описанными ранее [12]. Результаты обрабатывали статистически по t-критерию Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** На шестой день аллоксанового диабета у крыс активность всех четырех ферментов антиокислительной защиты в цитоплазматических фракциях печени и мозга изменялась значительно и достоверно (табл. 1 и 2). Так, активность каталазы в цитоплазматической фракции печени снижалась в 6 раз (83%), СОД - в 11 раз (88%), глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы - в 3,6 и 1,9 раза (72 и 48%) соответственно. В цитоплазматической фракции мозга активность каталазы и СОД снижалась при диабете приблизительно в два раза, активность глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы - на 22-24%.

Трехкратное введение МК-801 контрольным животным не изменяло активность всех антиокислительных ферментов в цитоплазматических фракциях печени и переднего мозга (за исключением повышения активности глутатионпероксидазы в печени на 31% и недостоверного снижения активности глутатионредуктазы в мозге на 29%).

После введения МК-801 животным, больных диабетом активность каталазы и глутатионредуктазы в печени и мозге не отличалась от контрольных показателей, а активность СОД и глутатионпероксидазы превышала контрольные уровни (в мозге превышение активности глутатионпероксидазы малодостоверно,  $P < 0,1$ ).

Активность каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) в печени и головном мозге снижается перед возникновением гипергликемии, и это снижение коррелирует с повышением концентрации малонового диальдегида (МДА) в эритроцитах (таблица 3). При возникновении гипергликемии на более поздних стадиях развития диабета (через 21 день после введения аллоксана) концентрация малонового диальдегида в эритроцитах становится еще более высокой, чем в преддиабетической стадии.

Данные литературы о действии экспериментального диабета на активность антиокислительных ферментов в печени, мозге и других тканях во многом противоречивы. Так, после 2-10 недель экспериментального (вызванного введением стрептозотоцина или аллоксана) диабета у крыс активность каталазы и СОД

повышалась [13] либо снижалась [14] в печени и поджелудочной железе. Настолько же неоднородны данные литературы относительно активности СОД, каталазы, глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в почках, сердце, эритроцитах [15]. В мозге, мышцах и лимфоцитах активность СОД и каталазы отчетливо снижалась [7,8,16,17]. Во всех перечисленных работах измерение активности ферментов проводилось на препаратах животных в состоянии хронического диабета. В более ранние, преддиабетические сроки такие исследования, как правило, не выполнялись. В отдельных статьях, однако, было показано, что активность СОД, каталазы и глутатионредуктазы в поджелудочной железе крыс в состоянии преддиабета ниже, чем в контроле. Эти изменения наблюдались перед возникновением диабетической гипергликемии [18]. Янг и Чериан [15] показали, что активность СОД в печени и поджелудочной железе снижается уже через 30 часов после введения стрептозотоцина крысам. Таким образом, токсическое действие на  $\beta$ -клетки поджелудочной железы аллоксан и стрептозотцин могут оказывать намного раньше, чем на 2-10-й неделях.

В таблицах 1 и 2 показано, что достоверное снижение активности всех антиокислительных ферментов в печени и мозге крыс происходит на 6-й день развития экспериментального диабета, когда концентрация глюкозы в крови повышается несущественно (табл. 3). Эти данные свидетельствуют не только о том, что вводимый крысам аллоксан вызывает системные биохимические изменения, но и о том, что изменения в антиокислительных ферментах могут оказаться первичными биохимическими нарушениями и в печени, и в мозге [19].

Таблица 1. Активность антиокислительных ферментов в цитоплазматической фракции печени крысы при диабете и введении МК-801

Фермент	Контроль	Диабет	МК-801	Диабет+МК-801
Каталаза 1/сек на 1 мг белка	0,43±0,10	0,073±0,007*	0,49±0,20	0,60±0,05
Супероксиддисмутаза ед на 1 мг белка	51±2	4,5±0,3*	50±6	68±5*
Глутатионредуктаза нмоль/мин на 1 мг белка	82±7	23±0,8*	80±11	76±3
Глутатионпероксидаза нмоль/мин на 1 мг белка	450±27	234±35*	590±46	1040±10*

Приведены средние значения и среднеквадратичные отклонения от средних для числа экспериментов  $n=4-6$ . Одна единица активности супероксиддисмутазы определена как количество фермента, необходимое для снижения скорости восстановления нитротетразолия синего в системе ксантин-ксантинооксидаза на 50%. \* Достоверное отличие от соответствующего показателя в контрольной группе,  $P<0,05$ .

Таблица 2. Активность антиокислительных ферментов в цитоплазматической фракции переднего мозга крысы при диабете и введении МК-801

Фермент	Контроль	Диабет	МК-801	Диабет+МК-801
Каталаза 1/сек на 1 мг белка	11,3±2,0	4,8±0,8*	12,9±3,0	10,7±1,6
Супероксиддисмутаза Ед $\times 10^{-4}$ на 1 мг белка	10,0±0,8	4,7±0,37*	11,6±3,0	17,0±0,5*
Глутатионредуктаза нмоль/мин на 1 мг белка	45±7	35±2*	32±6	38±4
Глутатионпероксидаза нмоль/мин на 1 мг белка	112±5	85±9*	120±7	130±6

Приведены средние значения и среднеквадратичные отклонения от средних для числа экспериментов  $n=4-6$ . Другие обозначения - как в подписи к Табл. 1. \* Достоверное отличие от соответствующего показателя в контрольной группе,  $P<0,05$ .

Таблица 3. Концентрация глюкозы в цельной крови, активность СОД и каталазы и содержание МДА в эритроцитах крыс при диабете и введении МК-801.

Показатель	Контроль	Диабет 6 дней	Диабет 6 дней + МК-801	Диабет 21 день
Глюкоза в крови, ммоль на 1 л	7,1±0,7	9,0±1,1	11,0±2,3*	30,0±2,7*
СОД в эритроцитах, ед на 1 мл	1700±100	2600±120*	2100±150	2700±200*
Каталаза в эритроцитах, 1/сек на 1 мл	18±2	39±6*	30±4*	45±11*
Малоновый диальдегид в эритроцитах, нмоль на 1 мл	148±16	390±26*	130±12	560±55*

Приведены средние значения и среднеквадратичные отклонения от средних для числа экспериментов n=4-26. Другие обозначения - как в подписи к Табл. 1. \*Достоверное отличие от соответствующего показателя в контрольной группе, P<0,05.

Что касается участия NMDA-рецепторов в молекулярном механизме нейротоксического действия аллоксана, то этот вопрос в литературе разработан недостаточно. Известно лишь, что при стрептозотоциновом диабете у крыс не изменяется степень связывания <sup>3</sup>H-глутамата с NMDA-рецепторами в коре мозга, полосатом теле, гиппокампе и мозжечке [20] и не нарушается функция NMDA-рецепторов в срезах гиппокампа [21]. Наши данные (табл. 1 и 2) не согласуются с приведенными литературными данными: в ранней фазе аллоксанового диабета активность антиокислительных ферментов в печени и переднем мозге не снижается у животных, которым предварительно был введен препарат МК-801. Иными словами, МК-801, как специфический антагонист глутаматных NMDA-рецепторов, защищает антиокислительные ферменты в печени и мозге от инактивации при аллоксановом диабете. Более того, после введения МК-801 восстанавливается нормальная концентрация малонового диальдегида в эритроцитах (табл. 3), причем и избыточная наработка продуктов перекисного окисления липидов (индикатором которой является уровень малонового диальдегида) на 6-й день диабета, и нормализация этой функции эритроцитов после курса введения МК-801 происходят в условиях нормогликемии. Это может являться доказательством участия глутаматных NMDA-рецепторов в механизме, вызывающем снижение активности ферментов при развитии диабета.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ № 98-04-48548).

#### ЛИТЕРАТУРА

- 1 Большая медицинская энциклопедия (1977), т.7, с. 222-224. М., Советская энциклопедия
- 2 Biessels G.J., Kappelle A.C., Bravenboer B., Erkelens D.W., Gispen W.H. (1994). 7, 643-650
- 3 Kurita A., Katayama K., Mochio S. (1996). Diabetes Care. 19, 360-364
- 4 Mooradian A.D. (1997). Brain Res. Brain Res. Rev. 23, 210-218
- 5 Sato Y., Hotta N., Sakamoto N. (1979). Biochem. Med. 21, 104-107

- 6 Santini S.A., Marra G., Giardina B., Cotroneo P., Mordente A., Martorana G.E., Manto A., Ghirlanda G. (1997). *Diabetes*. **46**, 1853-1858
- 7 Makar T.K., Rimpel-Lamhaouar K., Abraham D.G., Gokhale V.S., Cooper A.J. (1995). *J. Neurochem.* **65**, 287-291
- 8 Kumar J.S., Menon V.P. (1993). *Metabolism*. **42**, 1435-1439
- 9 Mukherjee B., Mukherjee J.R., Chatterjee M. (1994). *Immunol. Cell Biol.* **72**, 109-114
- 10 van Dam P.S., van Asbeck B.S., Bravenboer B., van Oirschot J.F., Gispen W.H., Marx J.J. (1998). *Free Radic Biol. Med.* **24**, 18-26
- 11 Calcutt N.A., Chaplan S.R. (1997). *Br. J. Pharmacol.* **122**, 1478-1482
- 12 Kosenko E., Kaminsky Y., Kaminsky A., Valencia M., Lee L., Hermenegildo C., Felipo V. (1997). *Free Rad. Res.* **27**, 637-644
- 13 Kakkar R., Kalra J., Mantha S.V., Prasad K. (1995). *Mol. Cell Biochem.* **151**, 113-119
- 14 Wohaieb S.A., Godin D.V. (1987). *Diabetes*. **36**, 1014-1018
- 15 Yang J., Cherian M.G. (1994). *Life Sci.* **55**, 43-51
- 16 Altan N., Yigit S., Elmali E., Malhatun E., Rota S., Kilic N. (1997). *Gen. Pharmacol.* **28**, 795-796.
- 17 Vucic M., Gavella M., Bozikov V., Ashcroft S.J., Rocic B. (1997). *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **35**, 517-521.
- 18 Roza A.M., Pieper G.M., Johnson C.P., Adams M.B. (1995). *Pancreas*. **10**, 53-58
- 19 Novelli E.L., Rodrigues N.L., Ribas Ozonas B. (1987). *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* **37**, 377-393
- 20 Gagne J., Milot M., Gelinis S., Lahsaini A., Trudeau F., Martinoli M.G., Massicotte G. *Diabetes*. **46**, 841-846
- 21 Chabot C., Massicotte G., Milot M., Trudeau F., Gagne J. (1997) *Brain Res.* **768**, 249-256

Поступила 12.01.99 г.

**ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES IN LIVER AND BRAIN DECREASE IN EARLY DIABETES STAGES AND THIS DECREASE IS RELATED WITH THE NMDA RECEPTOR FUNCTION**

E.A.KOSENKO, A.Y.KAMINSKY\*, Y.G.KAMINSKY+

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, Russia 142292; FAX: (0967) 790553; E-mail address: kaminsky@trik.itb.serpukhov.su

\*Moscow State University, Physical Faculty, Moscow, Russia 117234

Antioxidant enzyme activities in rat liver and forebrain and the effect of the MK-801 administration on these activities were estimated on 6<sup>th</sup> day of alloxan-induced diabetes. The catalase, superoxide dismutase, glutathione reductase, and glutathione peroxidase activities of cytosolic fractions from both liver and forebrain were shown to decrease significantly in prediabetic rats, and these alterations were virtually prevented by the course of MK-801 administration. The results suggest that the suppression of antioxidant enzymes can be the primary biochemical disturbance in diabetes progression and that glutamate NMDA receptors can be involved in the molecular mechanism underlying this condition.

**Keywords:** diabetes, antioxidant enzymes, liver, brain, NMDA receptor