

УДК 616.379-003.64-092-074

©Коллектив авторов

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВАНАДИЙ-СОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ ИНСУЛИНО-ПОДОБНЫМ ДЕЙСТВИЕМ.

ГОЛУБЕВ М.А., ГОРОДЕЦКИЙ В.К., АНИСЬКИНА А.П., ТОЧИЛКИН А.И.,
БЕЛЯЕВА Н.Ф.

НИИ биомедицинской химии РАМН, ГНИЦ ПМ МЗ РФ.

На модели стрептозотоцинового диабете у крыс изучено содержание глюкозы, гликированного альбумина, гликированного гемоглобина, активность глюкокиназы, АСТ, АЛТ и амилазы при длительном применении ортованадата и ванадил - сульфата. Показано, что как при введении ортованадата так и ванадил - сульфата происходит нормализация исследуемых параметров у диабетических крыс. Однако при введении ванадил - сульфата инсулиноподобный эффект был более выражен. Исследование LD 50 при внутрибрюшинном введении и при введении через зонд, анализ цитотоксичности на гепатоцитах показал, что ванадил - сульфат является менее токсичным соединением и может рассматриваться как основа в синтезе соединений обладающих гипогликемическим влиянием.

Ключевые слова: стрептозотоциновый сахарный диабет, гипергликемия, ванадий, инсулино-подобное действие ванадия, ортованадат натрия, ванадилсульфат.

ВВЕДЕНИЕ. С тех пор как впервые был описан инсулино-подобный эффект ванадия [1], в ряде работ показано, что ортованадат (Na_3VO_4), ванадил - сульфат (VO_2SO_4), метаванадат (NaVO_3) имитируют многие действия инсулина в его 3-х основных органах-мишенях: мышцах, печени, жировой ткани [2,3,4].

Установление факта, что введение этих соединений ванадия *per os* диабетическим крысам в эксперименте нормализовало содержание глюкозы в крови, улучшало ряд нарушенных функций в различных тканях без серьезных токсических поражений, дает возможность обсуждать проблему применения ванадий-содержащих соединений в лечении или профилактике сахарного диабета. Разнообразие инсулино-подобных эффектов ванадия показано как *in vitro*, так и *in vivo*. Ванадий оказывает многообразные эффекты на действие ферментов, что было показано как на гомогенатах тканей, так и в экспериментах на изолированных клеточных препаратах - культуре адипоцитов и гепатоцитов [5]. В 1979 году появилось первое сообщение о том, что

добавление ванадия в систему *in vitro* приводит к эффектам, сходными с действием инсулина [1]. Было показано, что ванадий стимулирует захват глюкозы и ее окисление в адипоцитах крысы, синтез гликогена в печени и диафрагме и ингибирует глюконеогенез в печени. В дальнейшем двумя независимыми группами исследователей [5,6] было установлено, что эти эффекты ванадия на транспорт глюкозы в гепатоцитах не были связаны с его известным свойством ингибировать Na^+/K^+ -АТФазу, и точный механизм действия ванадия остался неизвестным. Влияние разнообразных соединений ванадия *in vivo* на клеточный рост, клеточную трансформацию, онкогенез, функции рецепторов не изучены в деталях и до настоящего времени.

Многие эффекты ванадия связаны с его действием на различные ферментные системы живой клетки. Ванадат тормозил выработку глюкозы в перфузируемой печени крысы и усиливал гликолиз, влияя на различные ферменты гликолиза и глюконеогенеза. Например, ванадат ингибировал активность глюкозо-6-фосфатазы [7], стимулировал активность 2,3-бисфосфоглицератфосфатазы [8] и противодействовал влиянию глюкагона на активность 6-фосфофрукто-2-киназы в гепатоцитах и адипоцитах крысы [9]. Инсулиноподобное действие ванадия распространяется также и на пути метаболизма липидов. Ванадий ингибировал липолиз [10] и стимулировал липогенез в адипоцитах [11]. Некоторые эффекты ванадия *in vitro* несравнимы с действием инсулина на процессы метаболизма, они могут зависеть от типа ткани. В *m. epitrochlearis* крысы ванадат имитировал действие инсулина, повышая захват глюкозы, усиливая синтез гликогена и окисление глюкозы, но, в отличие от инсулина, не влиял на биосинтез и распад белков [12]. В эритроцитах ванадат снижал скорость гликолиза, ингибируя активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы [13]. В гепатоцитах ванадат активировал гликогенсинтазу, но инактивировал фосфорилазу [14], что противоположно его действию в адипоцитах. Показано, что после добавления ванадата происходило как повышение, так и снижение активности гликогенфосфорилазы [15,16]. Транспорт аминокислот в тонком кишечнике блокировался ванадатом, а в скелетной мышце, напротив, стимулировался [17]. Основные биологические эффекты ванадия, в частности инсулиноподобный и фактора роста подразумевают специфические биохимические механизмы. Ингибирование ванадатом протеиновых фосфотирозин фосфатаз (ФТФ) возможно наиболее важная. Тампага et al. обнаружили, что ванадат может прямо стимулировать аутофосфорилирование бета-субъединицы рецептора инсулина [18]. Но в дальнейшем эти находки не были подтверждены другими работами. Фосфорилирование тирозиновых остатков бета-субъединицы рецептора инсулина и IRS-1 (субстрат рецептора инсулина-1) - первые этапы в работе инсулинового рецептора при передаче гормонального сигнала внутрь клетки-мишени. Специфические фосфатазы - фосфотирозин протеин фосфатазы (ФТФазы; клонировано более 20 генов таких фосфатаз этой группы), - осуществляют процесс дефосфорилирования остатков тирозина бета-субъединицы, таким образом инактивируя инсулиновый рецептор. Показано, что существует два основных класса ФТФаз: первый - трансмембранные белки, второй - группа цитоплазматических ферментов [19]). При стрептозотоциновом диабете происходит увеличение активности цитозольных ФТФаз на 180% и трансмембранных на 80% на 8-й день после развития диабета. Ванадат является ингибитором цитозольных фосфатаз [20]. Таким образом можно

предположить, что одним из механизмов действия ванадия является его способность блокировать дефосфорилирование инсулинового рецептора опосредовано, через действие на специфические ФТФазы. Следует заметить, что цинк также является ингибитором ФТФаз в концентрациях 0,1 – 1,0 мМ, тогда как ванадий проявляет свой ингибирующий эффект в концентрациях 20 мкМ на цитозольную фракцию и 200 мкМ на трансмембранную фракцию ФТФаз.

Учитывая многообразие эффектов ванадия: стимуляция активности ферментов гликолиза, увеличение индукции мРНК гликолитических ферментов, ингибирование активности кислой и щелочной фосфатаз, ингибирование активности Na^+/K^+ -АТФазы, угнетение бисфосфатазной и увеличение киназной активности бифункционального фермента - фосфофруктокиназы-2/фруктозо-2,6-бисфосфатазы, ингибирующий эффект на ФТФазы и ряд других свойств позволяют говорить о множественных эффектах ванадий -содержащих соединений, оставляя нераскрытым точный механизм инсулино-подобного действия ванадия как *in vitro* так и *in vivo*.

МЕТОДИКА. В эксперименте использовались крысы-самцы линии Вистар, массой 250 - 300 г. Экспериментальный диабет вызывали единичной внутрибрюшинной инъекцией стрептозотоцина (60 мг/кг веса, «Fluka» Швейцария). За ходом развития диабета следили по появлению в моче глюкозы и кетоновых тел, по повышению содержания глюкозы в крови, по увеличению потребления воды и диуреза, снижению массы тела. В опыт брали крыс с уровнем гликемии выше 19 ммоль/л.

Определение гликогена в гомогенатах печени проводили по методу [21] с использованием амилоглюкозидазы и последующим определением глюкозы глюкозооксидазным методом. Гликированные белки крови HbA_{1c} и гликированный альбумин (ГА) подвергали кислотному гидролизу в ТХУ, а гидролизованную фруктозу определяли колориметрическим способом с тиобарбитуровой кислотой [22]. Количество гликированного гемоглобина и альбумина выражали в процентах от общего количества гемоглобина и альбумина соответственно. Концентрацию гемоглобина в крови определяли унифицированным гемоглобинцианидным методом, а содержание альбумина унифицированным методом по реакции с бромкрезоловым зеленым [23]. Активность глюкокиназы определяли по методу [24].

Взвесь гепатоцитов получали после двухэтапной перфузии печени по Seglen с использованием 0,05% раствора коллагеназы (тип 4, «Sigma» США), с последующей гомогенизацией ткани. Оценка жизнеспособности гепатоцитов проводилась с использованием 0,6% трипанового синего [25].

Определение LD50 для ванадил-сульфата и ортованадата («Fluka») проводили при внутрибрюшинном введении посредством инъекции и введении внутривентрикулярно через зонд.

Внутриклеточное содержание ванадия в печени, селезенке, почках и других тканях проводили методом атомно-адсорбционной спектрометрии после растворения навесок тканей в азотной кислоте.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Проведено сравнительное изучение двух соединений ванадия - пентавалентного ортованадата (Na_3VO_4) и четырехвалентного ванадил-сульфата (VOSO_4) в условиях длительного применения указанных препаратов. Ортованадат вводили с питьевой водой в концентрации 0,04% (40 мг на 100 мл) в течение 28 дней как диабетическим, так и

контрольным животным. Один раз в неделю у крыс измеряли содержание глюкозы в крови. При этом наблюдалась тенденция к нормализации содержания глюкозы при диабете, под действием ванадата однако возвращения к норме не наступало (см. табл.1). В крови испытуемых животных проводили определение гликированных гемоглобина и альбумина, определяли активность АСТ, АЛТ и амилазы (см. табл.1). При исследовании содержания гликированных белков крови наблюдался инсулино-подобный эффект ортованадата, наблюдалась устойчивая тенденция к нормализации активности изучаемых ферментов.

В печени диабетических животных резко падало содержание гликогена (с $40,0 \pm 1,1$ мг/г в контроле до $1,7 \pm 0,4$ мг/г при диабете). А также резко снижалась активность глюкокиназы (с $3,27$ мкмоль/мин/г ткани в контроле до $0,05$ мкмоль/мин/г ткани при диабете). В результате длительного потребления ортованадата происходило восстановление содержания гликогена и активности фермента практически до нормальных значений ($35,2 \pm 2,7$ мг/г и $2,08 \pm 0,16$ мкмоль/мин/г ткани соответственно). Таким образом ортованадат нормализовал изучаемые параметры метаболизма углеводов, обладая при этом ярко выраженным гипогликемическим эффектом. Однако данное соединение довольно токсично, летальность достигала в ряде экспериментов 50 %. Следует учесть, что часть животных погибала вследствие дегидратации организма, т.к. отказывалась пить раствор ванадата. Ортованадат является пятивалентным соединением ванадия, именно с этим и связывают его высокую токсичность. Показано, что при проникновении в клетку ванадат 5-валентный переходит в ванадил-ион - 4-х валентное состояние, обладающее менее выраженными токсичными свойствами. Данное превращение было признано как своего рода детоксикационный процесс [26]. Следующую серию экспериментов проводили с использованием ванадил-сульфата - 4-х валентного соединения ванадия. Условия эксперимента оставались идентичными первой серии опытов. Показано, что ванадил-сульфат, как и ортованадат, обладает инсулиноподобным действием. После приема ванадила обнаружено значительное падение содержания глюкозы крови, снижение содержания гликированного гемоглобина и альбумина, нормализация активности АСТ, АЛТ и амилазы. Следует отметить, что при соблюдении одинаковых условий проведения эксперимента инсулино-подобный эффект ванадил-сульфата был выражен более значительно по сравнению с опытами, где использовался ортованадат (см. табл.1). Содержание гликогена у крыс, получавших ванадил-сульфат, практически приближалось к нормальным значениям и было выше значений, полученных для ортованадата ($39,4 \pm 2,8$ мг/г в контроле и $37,8 \pm 1,4$ мг/г после лечения ванадил-сульфатом). Активность глюкокиназы нормализовалась и составляла $2,8$ мкмоль/мин/г ткани. Летальность при приеме ванадил-сульфата составляла 20%.

Исследование токсичности ортованадата и ванадил-сульфата проводили двумя способами: 1. Определение цитотоксичности на изолированных гепатоцитах крыс (см. табл.2), определение LD50 (см. табл.3). Приготовленную клеточную суспензию инкубировали в течение 2-х часов с различными концентрациями соединений ванадия. Как видно из таблицы 2, ванадил-сульфат в концентрации до 1,0 мМ практически не токсичен для клеток печени. Результаты определения LD50 показывают, что ванадил-сульфат в 3 раза менее токсичен по сравнению с ортованадатом как при внутрибрюшинном, так

и при внутрижелудочном введении. По видимому, факт более низкой токсичности при внутрижелудочном введении можно объяснить малой скоростью абсорбции соединений ванадия из желудочно-кишечного тракта.

Таблица 1. Содержание глюкозы, гликированных белков, активность ферментов крови нормальных и диабетических крыс, получавших различные соединения ванадия.

Показатели	контроль (n=8)	диабет (n=10)	диабет+ ортованадат (n=8)	Диабет+ ванадил-сульфат (n=10)
Глюкоза (ммоль/л)	6,5 ± 0,4	23 ± 1,2	15,3 ± 1,3*	12,1 ± 2,8
HbA _{1c} (%)	4,6 ± 0,4	7,8 ± 0,7	6,9 ± 0,5**	6,0 ± 0,4
ГА(%)	10,4 ± 0,3	23,0 ± 0,6	19,0 ± 0,8**	17,0 ± 0,7
АСТ (ед/л)	80 ± 7	120 ± 11	104 ± 8,5	90 ± 8
АЛТ (ед/л)	185 ± 15	202 ± 15	175 ± 17	180 ± 13
АМИЛАЗА (усл. ед.)	8380 ± 340	7550 ± 430	9210 ± 290**	8520 ± 310

Примечание: *P < 0,01, **P < 0,05 по отношению к диабет+ванадил-сульфат

Таблица 2. Оценка жизнеспособности гепатоцитов (%) в присутствии различных концентраций ванадил - сульфата(VOSO₄) и ортованадата (Na₃VO₄) после 2-х часовой инкубации

ОБРАЗЦЫ КЛЕТОК	КОНЕЧНАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ мМ Na ₃ VO ₄ , VOSO ₄	ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ %	
		Na ₃ VO ₄ ,	VOSO ₄
КОНТРОЛЬ		89,6 ± 4,2	89,6 ± 4,2
ОПЫТ	0,1	-	88,2 ± 3,0
	0,2	-	88,4 ± 3,8
	0,5	73,3 ± 3,4	88,4 ± 3,2*
	1,0	-	86,9 ± 2,8
	1,5	50,5 ± 4,2	81,5 ± 2,1*
	2,0	-	78,1 ± 2,3
	3,0	-	71,5 ± 3,1

Примечание: *P < 0,01 по отношению к опытам, где использовался ортованадат

При использовании ванадил-сульфата в качестве препарата, обладающего гипогликемическим влиянием происходит его накопление в различных органах и тканях. После приема ванадил-сульфата методом атомно-адсорбционной спектрометрии ванадий обнаруживался в количестве 0,98±0,06 мкг/г сырого веса в печени, в почках и селезенке – 4,44±0,23 мкг/г и 5,81±0,75 мкг/г соответственно. Ванадий способен накапливаться в дозах необходимых для проявления инсулиноподобного действия, но не достигает порога токсичности [27].

Исследования проведенные в данной работе показывают, что соединения ванадия в различной степени нормализуют содержание глюкозы крови и другие показатели обмена углеводов. Другими словами у разных соединений ванадия своя степень выраженности гипогликемического эффекта. Более того эти соединения имеют разную степень токсичности. Полученные результаты подтверждают тот факт, что четырехвалентные соединения ванадия

обладают большей биологической активностью, чем пентавалентные и менее токсичны для организма. Снижение токсичности можно объяснить переходом ванадия из 5-валентного состояния в 4-х валентное под действием глутатиона.

До последнего времени окончательно не выяснены механизмы действия ванадия на клетку, хотя некоторые его биологические эффекты могут частично объяснить инсулиноподобное действие. Ванадий как и инсулин, увеличивает аутофосфорилирование и тирозин-киназную активность инсулиновых рецепторов посредством ингибирования фосфотирозиновых фосфатаз [28]. Показано действие соединений ванадия на активность цАМФ-зависимой протеинкиназы. Комплекс ванадил-глутатион и ортованадат натрия ингибировали активность каталитической субъединицы протеинкиназы и препятствовали фосфорилированию Kemptide-пептида - субстрата цАМФ-зависимой протеинкиназы [29]. В печени диабетических крыс, которых поили ванадиллом или ванадатом, обнаружили увеличение скорости гликолиза, повышение гликогенсинтетазной активности, увеличение запасов гликогена, увеличение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [30]. Кроме того, ванадат как бы противодействует эффекту глюкагона [9], приводя таким образом к увеличению содержания фруктозо-2,6-бисфосфата - наиболее мощного из всех известных активаторов фосфофруктокиназы-1.

Создание новых не токсичных соединений ванадия, обладающих сильным инсулиноподобным действием является предметом нашего дальнейшего исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tolman E.L., Barris E., Burns M., Pansisni A., Partridge R. (1979) *Life Sci.*, **25**, 1159-1164.
2. Degani H., Gochin M., Karlsh S.J.D., Shechter Y. (1981) *Biochemistry*, **20**, 5795-5799.
3. Gil J., Miralpeix M., Careras J., Bartrons R. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 1868-1871.
4. Goldfine A.B., Simonson D.C., Folli F., Patti M.E., et al. (1995) *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism.*, **80**, 3311-3320.
5. Dubyak G.R., Kleizeller A. (1980) *J. Biol. Chem.*, **255**, 5306-5312.
6. Shechter Y., Karlsh S.J.D. (1980) *Nature.*, **284**, 556-558.
7. Singh J., Nordlie R.C., Jorgenson R.A. (1981) *Biochim. Biophys. Acta.*, **678**, 477-482.
8. Mendz G.L., Hyslop S.J., Kuchel P.W. (1990) *Arch. Biochim. Biophys.*, **276**, 160-165.
9. Rodriguez-Gil J.E., Gomez-Fox A.V., Fillat C. et al. (1990) *Diabetes*, **40**, 1355-1359.
10. Bruck R., Prigozin H., Krepel Z., Potenberg P. et al. (1991) *Hepatology*, **14**, 540-552.
11. Castro J., Maguedano A., Olive M. (1984) *Biochem Int.*, **9**, 413-419.
12. Clark A.S., Fagan J.M., Mitch W.E. (1985) *Biochem. J.*, **232**, 273-279.
13. Benabe J.E., Echegoen L.A., Pastrana B. et al. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 9535-9561.

14. *Bosch F., Arino J., Gomez-Fox A.M., Giunovart J.J.* (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 218-222.
15. *Jackson T.K., Salhanick A.I., Sparks J.D., Sparks C.E. et al.* (1988) *Diabetes*, **37**, 1234-1241.
16. *Stront H.V., Vicario P.P., Saperstein R., Slaten E.E.* (1989) *Endocrinology.*, **124**, 1918-1923.
17. *Henriksen E.Y.* (1991) *Am. J. Physiol.*, **261**, C608-C612.
18. *Tamura S., Brown T.A., Dubler R.E., Lamén G.* (1983) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **113**, 80-86.
19. *Fisher E. H., Charbonneau H., Torks N.K.* (1991) *Science*, **253**, 401-406.
20. *Goldstein B.J.* (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 33-42.
21. *Попов А.И., Чубисов И.В.* (1977) *Современные методы биохимии.* Москва, 136-146.
22. *Городецкий В.К., Михайлов В.И.* (1977) *Современные методы биохимии,* Москва, 120-126.
23. *Справочник. Лабораторные методы исследования в клинике. М. Медицина 1987, с.107-108, 176-177.*
24. *Davidson A.L., Arion W.J.* (1987) *Arch. Biochem. Biophys.*, **253**, 156-167.
25. *Голубев М.А., Маркова М.С., Стволинская Н.С.* (1993) *Клин. Лаб. Диагностика*, **6**, 13-15.
26. *Rehder D.* (1991) *Angew. Chem. Int.*, **30**, 148-167.
27. *Mongold J.J., Cros G.H., Tep F. et al.* (1990) *Pharm. Toxic.*, **67**, 192-198.
28. *Schieven G.L., Wahl A.F., Myrdal S. et al.* (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 20824-20831.
29. *Brownsley R.W., Doug G.W.* (1995) *Mol. Cell. Biochem.*, **153**, 131-137.
30. *Verma S., Cam M., McNeill J.H.* (1998) *J. Am. Coll. Nutr.*, **17**, 11-18.

Поступила 29.02.2000

THE COMPARISON STUDY OF VANADIUM-COMPOUNDS WITH INSULIN-MIMETIC PROPERTIES

GOLUBEV M.A., GORODETSKY V.K., ANISKINA A.P., TOCHILKIN A.I.,
BELYAEVA N.F.

Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Moscow, Russia

The serum glucose concentration, HbA_{1c}, fructoseamine, the activity of AST, ALT, amylase, glycogen content and glucokinase activity in rat hepatocytes were examined in streptozotocin-diabetic rats during long-term orthovanadate and vanadyl sulphate treatment. The improvement of this parameters were demonstrated after oral orthovanadate and vanadyl sulphate administration. However, insulin-mimetic properties of vanadyl sulphate were more marked in comparison with orthovanadate. LD-50 and cytotoxicity analysis in isolated hepatocytes showed that vanadyl sulphate was less toxic than orthovanadate.

Key words: streptozotocin diabetes mellitus, hyperglycemia, vanadium, insulino-mimetic properties of vanadium, sodium ortovanadate, vanadylsulfate.