

УДК 616.379-008.64
©Ризви, Сривастава

ПОСТУПЛЕНИЕ L-ЦИСТЕИНА В ЭРИТРОЦИТЫ ПРИ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА

С.И. Ризви, Н. Сривастава*

Университет Аллахабада, отделение биохимии, 211002 Аллахабад, Индия;
эл. почта: sirizvi@gmail.com

Окисдательный стресс эритроцитов вовлекается в патогенез диабета и недостаточность антиоксидативной защиты глутатинового пути (GSH), как полагают, является одним из факторов, ответственных за развитие осложнений при диабете. Эритроцитам необходим L-цистеин для синтеза GSH, и скорость синтеза определяется только доступностью L-цистеина.

Поступление L-цистеина в эритроциты определялось у здоровых и больных диабетом 2 типа.

В настоящем исследовании мы представили доказательства значительного снижения поступления L-цистеина в эритроциты пациентов с диабетом 2 типа по сравнению с одновременным контролем.

Уменьшенное поступление L-цистеина может быть одним из факторов, ведущим к снижению концентрации GSH, наблюдаемому при диабете 2 типа. Поскольку L-цистеин является лимитирующей кислотой в синтезе GSH, любая стратегия, направленная на увеличение поступления L-цистеина в эритроциты, может быть полезна для пациентов со 2 типом диабета

Ключевые слова: эритроциты, L-цистеин, диабет.

ВВЕДЕНИЕ. В многочисленных исследованиях, проведенных *in vitro* и *in vivo*, было показано, что на различные функциональные и структурные параметры эритроцитов отрицательно влияет окисдательный стресс. Действительно, изменения жидкостности мембран и инактивация связанных с мембранами рецепторов и ферментов [1], ионных параметров [2], усиление пероксидации липидов [3], окисление глутатиона и сульфгидрильных групп белка [4, 5] и активация протеолиза [6] – всё это описано в эритроцитах в условиях окислительного стресса. Было показано, что антиоксидательная способность эритроцитов при диабете 2 типа коррелировала с различными диабетическими осложнениями [7]. Сообщалось, что атеросклероз и микрососудистые осложнения при диабете связаны со сниженным антиоксидативным состоянием диабетических эритроцитов [8]. Важность исследования эритроцитов при диабете поддерживается наблюдениями, что антиоксидательная недостаточность и интенсивные нарушения, вызванные действием пероксидов, в эритроцитах предшествуют развитию выраженного диабетического состояния [9].

Эритроциты содержат значительные количества восстановленного глутатиона (GSH), который включается в клеточный ответ на окисдательный стресс [10]. Эритроцитарный окисдательный стресс вовлекается в патогенез диабета [11] и недостаточность антиоксидантной защиты по пути GSH, надо полагать, является одним из факторов, ответственных за развитие осложнений при диабете [12]. Другие исследования, включая наши наблюдения, показывают снижение уровня GSH при диабете 2 типа [13, 14], однако первичная причина снижения внутриклеточного GSH в эритроцитах при диабете 2 типа не доказана.

О поступлении L-цистеина в эритроциты сообщалось [15], это поступление зависит от концентрации и от времени. Эритроциты поглощают и переносят L-цистеин, когда его концентрация в плазме растёт и выделяют его в дистальных

* - адресат для переписки

ПОСТУПЛЕНИЕ L-ЦИСТЕИНА В ЭРИТРОЦИТЫ ПРИ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА

тканях, где концентрация L-цистеина сравнительно низка. Хотя эритроциты не имеют белок-синтезирующей системы, они требуют L-цистеин для синтеза глутатиона (GSH), который является трипептидом из глутаминовой кислоты, цистеина и глицина. Хотя для синтеза GSH требуется три аминокислоты, скорость синтеза GSH определяется только доступностью L-цистеина [16]. Функциональная –SH группа, которая придает GSH главную роль, поставляется аминокислотой L-цистеином.

В настоящем исследовании мы сообщили об изменении поступления L-цистеина в эритроциты человека при диабете 2 типа и также показали корреляцию между антиоксидантным потенциалом плазмы и поступлением L-цистеина в эритроциты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Подбор пациентов. Критерий для отбора пациентов с диабетом 2 типа был тот же самый, о котором сообщалось ранее [13, 17]. Кровь от 28 пациентов с диабетом (17 мужчин, 11 женщин) брали после получения их согласия, средний возраст 53 ± 6 лет, уровень глюкозы плазмы натощак $9,1 \pm 0,2$ mM. Индекс массы тела (ИМТ) 26 ± 4 кг/м², общий холестерин плазмы $5,2 \pm 1,5$ mM и длительность заболевания 10 ± 4 года. Ни у одного больного не было высокого давления крови или микроальбуминурии. Мы также старались исключить пациентов, родственники которых страдали гипертонией.

Контрольная группа, состоящая из 30 здоровых добровольцев, по возрасту и полу соответствовала группе пациентов с диабетом, уровень глюкозы плазмы натощак $4,6 \pm 0,6$ mM, ИМТ 25 ± 4 кг/м², общий холестерин плазмы $4,6 \pm 1,5$ mM. Ни один пациент из контрольной группы не страдал гипертонией. В контроль отбирались пациенты, родственники которых (два поколения) не страдали диабетом или гипертонией. Ни одна из обследованных женщин не подвергалась гормональному воздействию. Все добровольцы (диабетики и здоровые субъекты) были информированы о природе заболевания. Протоколы исследований соответствовали указаниям институтского комитета по этике.

Венозная кровь от здоровых добровольцев и пациентов с диабетом 2 типа была получена венопункцией в гепарин. Кровь центрифугировали при 1200 g в течение 10 мин при 4°C. После удаления плазмы, лейкоцитарной плёнки и верхних 15% спрессованных эритроцитов (RBC), оставшиеся эритроциты дважды промывали холодным фосфатно-солевым буфером (PBS) (0,95 NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,4).

Исследование поступления L-цистеина в эритроциты. Суммарное количество 0,25 мл отмытых центрифугированных эритроцитов суспендировали в 1 мл PBS, содержащем 8 mM глюкозы и 10 mM L-цистеина, и инкубировали 1 час при 37°C на водяной бане; концентрация L-цистеина, использованная для исследования поступления, и продолжительность инкубации были теми же самыми как сообщалось ранее [18]. В конце инкубации эритроциты удаляли, центрифугировали, а супернатанты выбрасывали. Концентрация свободных –SH групп в эритроцитах затем определялась как описано Sedlak и Lindsay [19].

Краткая методика: 100 мкл эритроцитов лизировались в 100 мкл 10% ТХУ (TCA), приготовленной в натрий-фосфатном–ЭДТА буфере (0,01 M фосфат натрия/0,005 M ЭДТА). Лизат эритроцитов затем центрифугировали при 12000 g в течение 5 мин, после чего 100 мкл супернатанта смешивали с 1,9 мл трис-ЭДТА буфера, содержащего 0,6 мкM/мл 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойную кислоту) (DTNB) (262 mM трис основания, 13 mM ЭДТА, pH 8,9). Пробы оставляли стоять 5 мин для развития окраски. Абсорбцию проб затем измеряли при 412 нм и концентрации свободных –SH групп рассчитывали с использованием коэффициента mM экстинкции, равного 13,6. Скорость поступления рассчитывали вычитанием контроля (эритроциты, инкубированные в PBS–глюкозе без L-цистеина в течение 1 часа при 37°C) концентрации свободных –SH групп из концентрации свободных –SH групп, полученных после обработки L-цистеином.

Определение железоредуцирующей способности плазмы. Величины железоредуцирующей способности плазмы (FRAP) были получены по методу Benzie и Strain [20]. Рабочий реактив FRAP готовили, смешивая ацетатный буфер (300 мМ, pH 3,6), раствор 2,4,6-три[2-пиридил]-S-триазин (10 мМ в 40 мМ HCl и раствор $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 ммоль/л) в соотношении 10:1:1, соответственно. 3 мл FRAP реактива смешивали со 100 мкл плазмы и смесь энергично перемешивали. Абсорбцию измеряли при 593 нм в интервале времени от 30 сек до 4 мин. Водные растворы известных концентраций Fe^{2+} в пределах 100-1000 мкмоль/л использовали для калибровки. Величины FRAP (мкмоль Fe(II) на литр) плазмы рассчитывали с использованием регрессионного уравнения.

Определение содержания GSH эритроцитов. Эритроцитарный GSH измеряли по методу Beutler [21]. Метод основан на способности сульфгидрильных групп восстанавливать 5,5'-дитиобис 2-нитробензойную кислоту (ДТНБ) и образовывать жёлто-окрашенный анионный продукт, оптическая плотность которого измеряется при 412 нм. Концентрация GSH выражается в мг на мл центрифугированных эритроцитов и определяется по стандартному графику.

Статистический анализ проводился с использованием программы Prism 4.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На рисунке 1 показано поступление L-цистеина в эритроциты здоровых людей и пациентов с диабетом 2 типа. Наблюдалось значительное снижение поступления L-цистеина в эритроциты при диабете. На рисунке 2 представлены данные по общему антиоксидантному потенциалу плазмы здоровых и больных диабетом 2 типа, измеренных в единицах железоредуцирующей способности плазмы (FRAP). Мы показали значительное снижение величины FRAP у пациентов со 2 типом диабета. Эритроциты диабетиков имели пониженную внутриклеточную концентрацию GSH по сравнению со здоровым контролем (рис. 3).

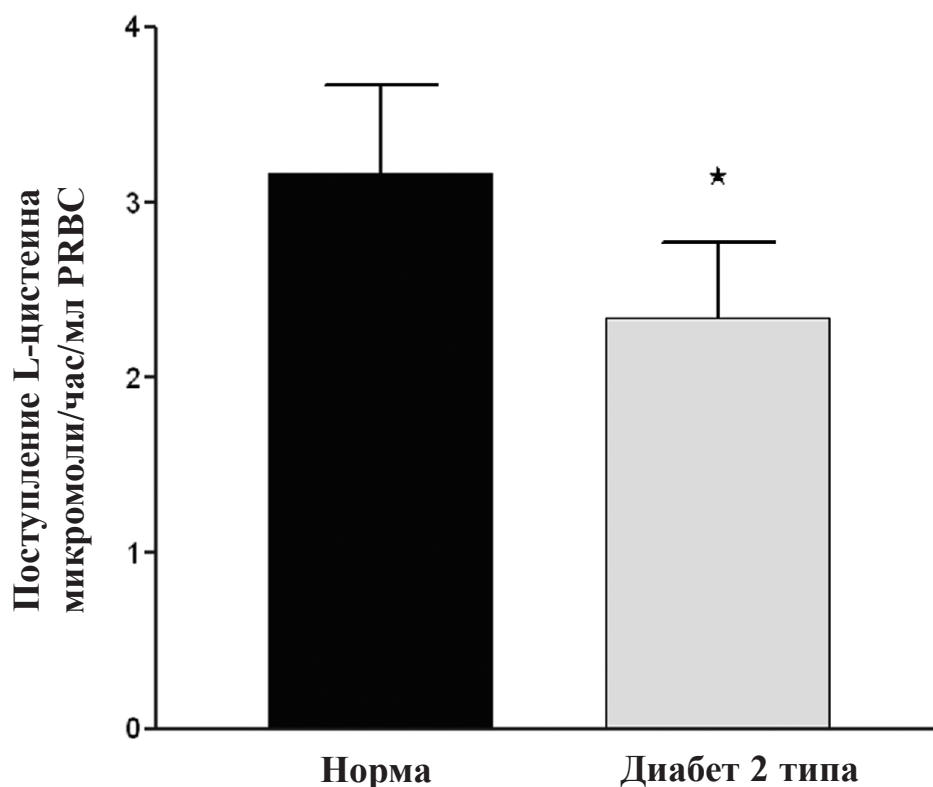


Рисунок 1.

Поступление L-цистеина в эритроциты здоровых людей и пациентов с диабетом 2 типа. Скорость поступления выражалась в микромолях/час/мл центрифугированных эритроцитов. $p < 0,01$ по сравнению с нормой.

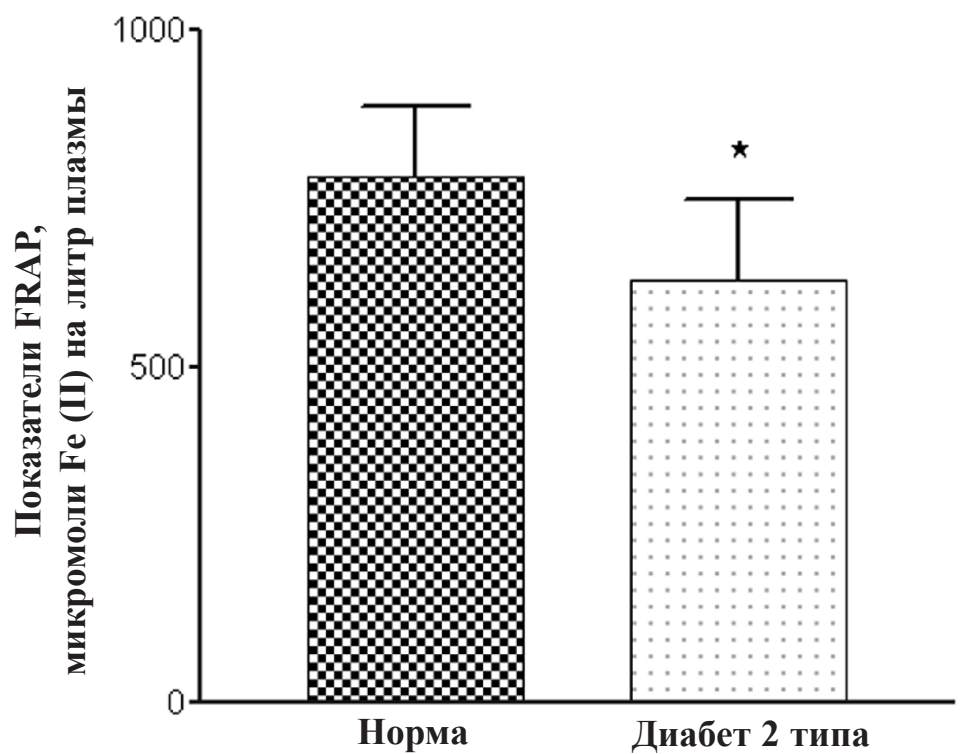


Рисунок 2.

Железоредактирующая способность плазмы (FRAP) здоровых и пациентов с диабетом 2 типа. FRAP выражалась в микромолях Fe (II) на литр плазмы $p < 0,01$ по сравнению с нормой.

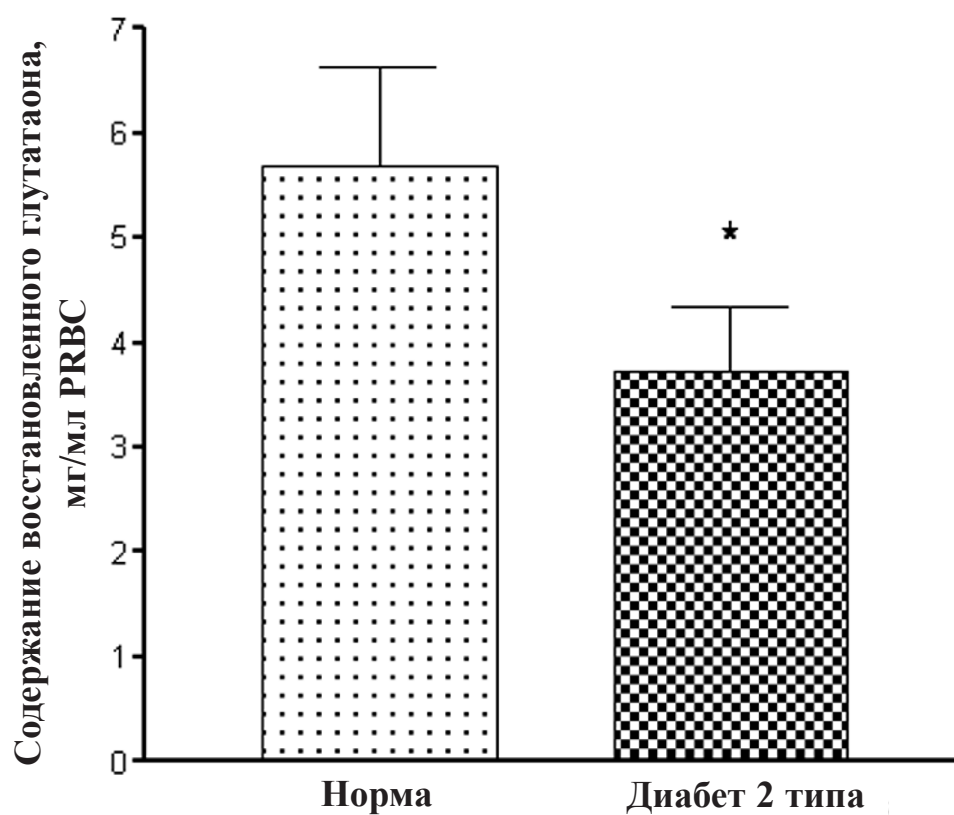


Рисунок 3.

Содержание в эритроцитах восстановленного глутатиона у здоровых и пациентов с диабетом 2 типа. Выражается в мг/мл PRBC. $p < 0,0001$ по сравнению с нормой.

Восстановленный глутатион – главное внутриклеточное небелковое сульфгидрильное соединение. GSH обладает многими биологическими функциями, включая поддержание мембранных белковых -SH групп в восстановленной форме, окисление которых может быть причиной изменения клеточной структуры и функции. Наши наблюдения сниженного уровня внутриклеточного GSH в эритроцитах при 2 типе диабета подтверждается более ранними сообщениями [22, 23]. Сниженное содержание GSH может привести клетки к снижению защиты против условий оксидативного стресса при диабете. Можно предположить, что диабетические осложнения могут быть результатом долгосрочного эффекта недостаточности внутриклеточного GSH [24].

Цистеин является “полунезаменимой” аминокислотой для человека, поскольку он может быть синтезирован из метионина, но в совершенно недостаточном количестве. Существуют доказательства, дающие возможность предположить, что потребление L-цистеина значительно увеличивается для поддержания редокс-статуса организма [25]. Дополнительный цистеин используется для разных целей у детей и у взрослых [26, 27]. Показано, что недостаточность GSH в эритроцитах при отёчной белково-калорийной недостаточности у детей обусловлена ухудшением синтеза, вызванного уменьшением снабжения цистеином [28]. Недавно мы сообщали о значительном снижении поступления цистеина в эритроциты при старении человека, это снижение поступления цистеина показывало сильную корреляцию со снижением общего антиоксидантного потенциала плазмы [18].

Помимо внедрения в растворимый антиоксидант GSH, L-цистеин сам играет важную роль в поддержании необходимого внутриклеточного редокс-статуса. Снижение поступления L-цистеина в эритроциты может воздействовать на внутриклеточный синтез GSH, поскольку синтез глутатиона в эритроцитах зависит от доступности L-цистеина, снижение поступления его может быть одним из факторов, ведущих к снижению концентрации GSH, наблюдающемуся при диабете 2 типа. Низкое внутриклеточное содержание GSH может воздействовать на внеклеточный пул GSH, поскольку эритроциты, как сообщалось, сильно влияют на внеклеточный пул GSH [14]. Для уточнения наших знаний, это первое сообщение о сниженном поступлении L-цистеина в эритроциты при диабете 2 типа.

Наши наблюдения о сниженном антиоксидантном потенциале плазмы у пациентов с диабетом 2 типа согласуются с более ранними наблюдениями, проведёнными на людях [29] и диабетических крысах [30]. Транспорт L-цистеина в эритроциты требует правильно редуцированных липидов мембран и тиольных групп белка [31]. Снижение антиоксидантного потенциала плазмы может вызвать структурные и конформационные изменения в мембранах и/или в аминокислотных переносчиках, что в конце концов приводит к снижению транспорта L-цистеина.

В недавних исследованиях Blouet и др. [32] показали, что при оксидативном стрессе у крыс, вызванном сахарозой, увеличенное потребление цистеина заметно снижает ухудшение редокс-статуса после потребления еды, кроме этого цистеиновый эффект может быть достигнут путем манипуляции с видами источников белка. Эти данные, взятые вместе с нашими результатами о снижении поступления цистеина в диабетические эритроциты дают возможность выдвинуть гипотезу о пользе для пациентов с диабетом увеличения потребления пищевых белков богатых цистеином.

ЛИТЕРАТУРА

1. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1986) Arch. Biochem. Biophys., **246**, 501-514.
2. Maridonneau I., Barquet P., Garay R.P. (1983) J. Biol. Chem., **258**, 3107-3113.
3. Rohan T.T., Nelson L.K., Waeg G., Quinn M.T. (1998) Biochem. Pharmacol., **56**, 1371-1379.

ПОСТУПЛЕНИЕ L-ЦИСТЕИНА В ЭРИТРОЦИТЫ ПРИ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА

4. *Snyder L.M., Fortier N.L., Leb L., McKenney J., Trainor J., Sheerin H., Mohandas N.* (1988) *Biochim. Biophys. Acta.*, **937**, 229-240.
5. *Cakatay U., Kayali R., Erdogan C., Orhan Y., Sivas A., Akcay T.* (2000) *Horm. Metab. Res.*, **32**, 40-43.
6. *Davies K.J.A., Goldberg A.L.* (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 8220-8226.
7. *Bryszewska M., Zawodnik I.B., Niekurzak A., Szosland K.* (1995) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **37**, 345-354.
8. *Saltsburg H., Katter Y., Aviary M., Levy Y.* (1999) *Isr. Med. Assoc. J.*, **1**, 228-231.
9. *Vijayalingam S., Parthiban A., Shanmugasundaram K.R., Mohan V.* (1996) *Diabet. Med.*, **13**, 715-719.
10. *Maritim A., Sanders R., Watkins J.* (2003) *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **17**, 24-38.
11. *Nwose E.U., Jelinek H.F., Richards R.S., Kerr P.G.* (2007) *Br. J. Biomedical. Sci.*, **64**, 35-43.
12. *Dincer Y., Akcay T., Alademir Z., Ilkova H.* (2002) *Metabolism*, **51**, 1360.
13. *Rizvi S.I., Zaid M.A., Anis R., Mishra N.* (2005) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **32**, 70-75.
14. *Nwose E.U., Jelinek H.F., Richards R.S., Kerr P.G.* (2006) *Redox Rep.*, **11**, 99-104.
15. *Yildiz D., Uslu C., Cakir Y., Oztas H.* (2006) *Free Radic. Res.*, **40**, 507-512.
16. *Griffith O.W.* (1992) *Free Radic. Biol. Med.*, **27**, 922-935.
17. *Rizvi S.I., Zaid M.A.* (2005) *Clin. Chim. Acta*, **354**, 59-67.
18. *Rizvi S.I., Maurya P.K.* (2008) *Rejuvenation Research*, **11**, 661-665.
19. *Sedlak J., Lindsay R.H.* (1963) *Anal. Biochem.*, **25**, 192-205.
20. *Benzie I.F.F., Strain J.J.* (1996) *Anal Biochem.*, **239**, 70-76.
21. *Beutler E., Duron O., Durate B.M.K.* (1963) *J. Lab.Clin. Med*, **51**, 882-888.
22. *Rizvi S.I., Abu Zaid M.* (2001) *J. Physiol. Pharmacol.*, **52**, 483-488.
23. *Dincer Y., Alademir Z., Iikova H., Akcay T.* (2002) *Clin. Biochem*, **35**, 297-301.
24. *Coleman M.D., Rustiom C.V.* (1999) *J. Pharm. Pharmacol.*, **51**, 21-25.
25. *Breitkreutz R., Pittack N., Nebe C.T., Schuster D., Brust J., Beichert M., Hack V., Daniel V., Edler L., Droge W.* (2000) *J. Mol. Med.*, **78**, 55-62.
26. *Sen C.K., Packer L.* (2000) *Am. J. Clin. Nutr.*, **72**, 653S-669S.
27. *Badaloo A., Reid M., Forrester T., Heird W.C., Jahoor F.* (2002) *Am. J. Clin. Nutr.*, **76**, 646-652.
28. *Reid M., Badaloo A., Forrester T., Morlese J.F., Frazer M., Heird W.C., Jahoor F.* (2000) *Am. J. Physiol.*, **278**, E405-E412.
29. *Sugherini L., Valentini M., Cambiaggi C., Tanganelli I., Gragnoli G., Borgogni P., Comporti M., Pompella A.* (2000) *Clin Chem. Lab. Med.*, **38**, 983-987.
30. *Cakatay U., Kayali R.* (2006) *Clin Biochem*, **39**, 907-912.
31. *Blouet C., Mariotti F., Azzout-Marniche D., Mathe V., Mikogami T., Tome D., Hunneau J.F.* (2007) *Free Radic. Biol. Med.*, **42**, 1089-1097.

Поступила: 12. 09. 2008.

L-CYSTEINE INFLUX IN DIABETIC ERYTHROCYTES

S.I. Rizvi, N. Srivastava

Department of Biochemistry, University of Allahabad, Allahabad, 211002 India;
tel.: 0091 9415305910; fax: 0091 532 2623221; e-mail: sirizvi@gmail.com

Erythrocyte oxidative stress has been implicated in the pathogenesis of diabetes mellitus, and the deficiency of antioxidant defense by the glutathione (GSH) pathway is thought to be one of the factors responsible for development of complications in diabetes. Erythrocytes require L-cysteine for the synthesis of GSH and the rate of synthesis is determined only by L-cysteine availability. In the present study we have found that the L-cysteine influx in erythrocytes from type 2 diabetic patients was significantly lower compared to age-matched controls. The decreased influx may be one of the factors leading to low GSH concentration observed in type 2 diabetes. Since L-cysteine is the limiting amino acid in GSH synthesis, any strategy aimed to increase L-cysteine influx in erythrocytes may be beneficial for type 2 diabetic patients.

Key words: erythrocytes, L-cysteine, diabetes mellitus.