ФАРМАКОЛОГИЯ ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЫ

DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-2-16-20

ВЛИЯНИЕ ТАУРИНА НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ТКАНИ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИАБЕТЕ

Л. М. Овсепян, А. В. Зангинян, Г. С. Казарян, Г. В. Захарян[1]

Результаты исследования показали активирование процессов свободнорадикального окисления, снижение содержания глутатиона и понижение активности глутатионсодержащих ферментов (глутатионпероксидаза на 32,95 % и глутатионредуктаза — на 46,87 %, $p < 0{,}001$) в гомогенате ткани печени у крыс. Анализ уровней окислительной модификации белков и оксида азота показал повышение их содержания на 16 и 26 % ($p < 0{,}01$) соответственно в печени крыс с аллоксановым диабетом. Введение таурина в дозе 50 мг/кг внутрибрюшинно в течение 20 дней приводит к уменьшению содержания в ткани печени гидроперекисей на 48,46 % и МДА — на 63,9 % ($p < 0{,}001$), а также частичной нормализации концентрации белков с окислительной модификацией и оснований Шиффа.

Ключевые слова: аллоксановый диабет; свободнорадикальное окисление; таурин; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет (СД) представляет собой заболевание, проявляющееся яркими нарушениями углеводного и энергетического обмена, сопровождающееся дисбалансом всех функциональных систем организма в результате хронической гипергликемии. Патогенез СД 1-го типа — сложный многоэтапный процесс, на сегодняшний день его считают классическим аутоиммунным заболеванием, в основе которого лежат генетические факторы и факторы внешней среды [11]. Поиск новых эффективных способов лечения СД является одной из важнейших проблем медицины и здравоохранения.

Таурин — 2-аминоэтансульфоновая кислота, относится к β-аминокислотам, является конечным продуктом обмена серосодержащих аминокислот: метионина, цистеина, цистеамина, регулирует различные клеточные функции, является антиоксидантом, влияет на ионный обмен, обладает противовоспалительным действием [9]. Имеются данные о включении таурина в лечение СД 2-го типа [12, 13]. Кроме того, таурин повышает содержание глутатиона и активизирует ферменты, содержащие его в своей структуре.

Целью настоящего исследования явилось определение уровней перекисного окисления липидов (ПОЛ), окислительной модификации белков, содержания оксида азота, оснований Шиффа и состояние тиолдисульфидной системы в гомогенате и митохондриальной фракции печени белых крыс с аллоксановым диабетом и после лечения таурином.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на беспородных белых крысах массой 170 – 200 г (виварий института Молекулярной биологии НАН РА), содержащихся в соответствии с правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей (Страсбург,1986 г.). Аллоксановый диабет (АД) вызывали введением 50 мг/кг аллоксана (Merck, Germany). Введение аллоксана приводит к токсическому повреждению поджелудочной железы, связанной с гибелью β-клеток островков Лангерганса. Животные были распределены на 3 группы по 20 в каждой: 1 — интактные, 2 — животные с АД, 3 — животные с АД, получавшие таурин (ЗАО при заводе химических реактивов, г. Ереван, Армения) в дозе 50 мг/кг внутрибрюшинно ежедневно, в течении 20 дней, начиная с 10 дня после введения аллоксана и установления стойкой гипергликемии. Уровень глюкозы в капиллярной крови определяли с помощью глюкометра Accu Chek Active на 10, 15 и 20 сут после введения аллоксана. В опыт брали животных с содержанием сахара больше чем 11 – 14 ммоль/л. Животных декапитировали под эфирным наркозом. После вскрытия извлекали печень, отмывали дистиллированной водой, измельчали лабораторными ножницами, гомогенизировали. После гомогенизации ткани печени в среде, содержащей 0,25 М сахарозы и 0,01 М трис-HCI буфера (pH 7,4) выделяли субклеточные фракции методом дифференциального

[1] Институт Молекулярной биологии НАН РА, Армения, Ереван, 0014, ул. Асратяна, 7.

центрифугирования на центрифуге К24. Ядра выделяли при 850 g в течение 15 мин, митохондрии — при 11000 g в течение 30 мин. Чистоту фракции оценивали по содержанию кардиолипина и его отсутствию в надмитохондриальной фракции [10]. Об активности ПОЛ судили по количеству гидроперекисей (ГП) и малонового диальдегида (МДА) в гомогенате и митохондриальной фракции печени крыс. ГП определяли по цветной реакции с тиоцианатом аммония при максимуме поглощения 480 нм, МДА определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой [2]. Интенсивность окраски МДА измеряли на смектрофотометре Thermo Scientific Evolution 201 (США) при длине волны 535 нм, а ГП — 480 нм. Для определения уровня окислительной модификации белков использовали метод Дубининой Е. Е. и др. Принцип метода основан на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразинов (2,4-ДФГ) с образованием производных 2,4-динитрофенилгидразонов [5]. После осаждения белков ткани печени 20 % трихлоруксусной кислотой добавляли 1 мл 0,1 М 2,4-ДФГ, растворенного 2 М HCl. Инкубацию осуществляли при комнатной температуре в течение 1 ч, затем пробы центрифугировали при 3000 g в течение 20 мин. Осадок промывали 3 раза смесью этанол — этилацетат (1:1 по объему) Полученный осадок высушивали для удаления растворителей и затем растворяли в 8 М мочевине. Мочевину приливали к осадку в объеме 3,0 мл. Оптическую плотность образовавшихся после инкубации динитрофенилгидразонов регистрировали при длинах волн 356 и 370 нм (альдегидные и кетонные продукты окислительной модификации нейтрального характера), а также при 430 и 530 нм (альдегидные и кетонные продукты окислительной модификации основного характера). Степень окислительной модификации белков выражали в единицах оптической плотности, отнесенных на мг белка гомогената, используя коэффициент молярной экстинкции 21000 $M^{-1}см^{-1}$ [5]. Концентрацию оксида азота определяли с помощью реактива Грейса [3]. К 0,4 мл гомогената печени добавляли 0,8 мл 0,5 nNaOH и 0,8 мл 10 %-го сульфата цинка ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$). После смешивания центрифугировали 15 мин при 3000 g. К супернатанту добавляли 2 мл реактива Грейса, оставляли на 10 мин при комнатной температуре. Раствор Грейса готовили заранее (1 % сульфаниламида, 0,1 % нафтилендиамина, 2,5 % фосфорной кислоты). В качестве стандарта использовали нитрит натрия. Адсорбцию измеряли на смектрофотометре Thermo Scientific Evolution 201 при длине волны 546 нм. Количество белка определяли по Лоури [18].

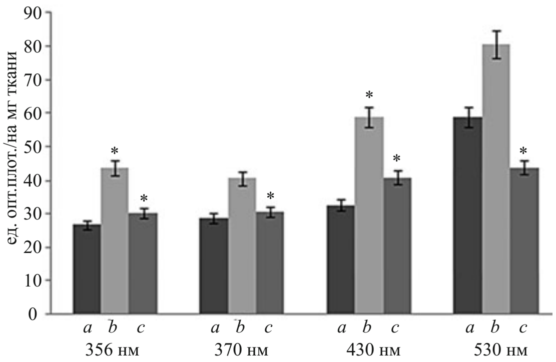
Активность глутатионпероксидазы определяли по реакции восстановления перекиси водорода (H_2O_2) и гидроперекисей липидов (ROOH) в присутствии GSH [6]. Активность глутатионредуктазы определяли спектрофотометрически по приросту НАДФН [10]. Для определения оснований Шиффа к гомогенату печени добавляли 5 мл гептан-изопропаноловой смеси (1:1 по объему) и встряхивали в течение 10 – 15 мин. Затем пробы центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об/мин для освобождения от белкового преципитата. Полученный осадок разбавляли в 5 мл гептан-изопропаноловой смеси (3:7 по объему) и смешивали с 2 мл раствора соляной кислоты (pH 2,0). Через 30 мин осторожно удаляли верхнюю (гептановую) фазу. К нижней (водно-спиртовой) фазе добавили 1 г сухого NaCl. Еще через 30 мин отбирали освобожденную от воды изопропанольную фазу. Оптическую плотность оснований Шиффа определяли при длине волны 400 нм выражали в условных единицах [8].

При оценке полученных результатов проводили статистическую обработку материала общепринятыми методами вариационной статистики. Для характеристики вариационного ряда были использованы статистические показатели: средняя арифметическая, среднее квадратичное отклонение, ошибка средней арифметической. Математическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы

Таблица 1. **Влияние таурина (50 мг/кг внутрибрюшинно ежедневно, 20 дней) на содержание продуктов перекисного окисления липидов, оксида азота, оснований Шиффа в гомогенате и митохондриальной фракции печени с аллоксановым диабетом ($n = 15$, в каждой группе 20 животных) ($M \pm m$)**

Группа/параметр	Контроль	Диабет	Диабет + таурин
Гомогенат			
Гидроперекиси Е (нмоль/мг белка)	0,72 ± 0,03	1,30 ± 0,04*	0,63 ± 0,02*
МДА (нмоль/мг белка)	8,20 ± 0,53	12,20 ± 0,45*	7,80 ± 0,38*
NO (мкмоль/г белка)	2,30 ± 0,05	5,43 ± 0,09*	4,70 ± 0,07*
Основание Шиффа (УЕ)	0,38 ± 0,06	0,52 ± 0,05*	0,43 ± 0,04*
Митохондриальная фракция			
Гидроперекиси Е (нмоль/мг белка)	0,47 ± 0,05	0,83 ± 0,35*	0,52 ± 0,06*
МДА (нмоль/мг белка)	5,12 ± 0,50	7,88 ± 0,40*	6,11 ± 0,40**
NO (мкмоль/г белка)	2,02 ± 0,08	3,34 ± 0,06	1,90 ± 0,05
Основание Шиффа (УЕ)	0,25 ± 0,02	0,44 ± 0,04*	0,32 ± 0,03**

* $p < 0{,}001$; ** $p < 0{,}01$.



Влияние таурина (50 мг/кг внутрибрюшинно, 20 дней) на уровень окислительной модификации белков в печени крыс с аллоксановым диабетом (n = 15, в каждой группе 20 животных).

356 нм — нейтральные кетонные производные окисленных белков;
370 нм — нейтральные альдегидные производные окисленных белков;
430 нм — основные кетонные производные окисленных белков;
530 нм — основные альдегидные производные окисленных белков.
По оси абсцисс — длина волны, по оси ординат — концентрация модифицированного белка (единицы оптической плотности на 1 мг белка);
a — контроль, b — аллоксановый диабет, c — аллокановый диабет + таурин.
* $p < 0{,}01$.

"SigmaPlot 11.0" с использованием специальных руководств по медицинской и биологической статистике.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ткани печени крыс с АД на 20 день развития диабета отмечается активирование процессов свободно-радикального окисления — увеличивается содержание ГП и МДА как в общем гомогенате, так и в митохондтиальной фракции печени белых крыс. (табл. 1).

Увеличению содержания продуктов ПОЛ в митохондриальной фракции печени крыс с экспериментальным СД способствует высокое содержание легко окисляемых субстратов, таких как полиненасыщенные жирные кислоты, а также наличие негемового железа в цитохромах дыхательной цепи, являющегося активатором ПОЛ. В этих условиях митохондриальная цепь переноса электронов становится мощным источником образования активных форм кислорода (АФК) — нестабильных и крайне реакционноспособных метаболитов. Показано, что двумя основными местами образования свободных радикалов в дыхательной цепи являются комплекс 1 (НАДН-коэнзим Q — редуктаза) и комплекс 2 (убихинон цитохром с — редуктаза) [1].

Исследование содержания оксида азота (NO) обнаружило его увеличение в гомогенате и в митохондриальной фракции печени животных с АД (табл. 1). При взаимодействии (NO) с супероксид-анионом образуются активные соединения нитрозоний (NO+), нитроксил (NO–) и пероксинитрит (ONOO). При повышенных концентрациях NO (> 1 мкМ) взаимодействует с комплексами дыхательной цепи (цитохромоксидаза, убихинон), приводя к угнетению синтеза АТФ [13]. Мишенями прямого действия NO являются атомы меди и цинка, входящие в состав ферментов. Установлено, что именно оксиду азота, который образуется в β-клетках поджелудочной железы, принадлежит важная роль в механизмах разрушения и гибели β-клеток, что и приводит к резкому уменьшению их количества и развитию СД [11, 19].

Накопление АФК в ткани печени вызывает окислительную модификацию белков, в результате чего усугубляются мембранные повреждения. Считают [16], что в состоянии окислительного стресса атаке АФК подвергаются в первую очередь не липиды, а белки мембран. Анализ окислительной деструкции белков печеночной ткани выявил достоверное повышение уровня динитрофенилгидразинов как основного, так и нейтрального характера (рисунок).

Полученные данные свидетельствуют о возрастании окислительного повреждения белков при АД. Фактически все аминокислотные остатки белков способны к окислению, что ведет к изменению функций белков. Окислению в первую очередь подвергаются сульфо- и аминогидроксильные группы аминокислот, что приводит к образованию поперечных сшивок между белками или между белком и другой молекулой, содержащей NH2-группу. Наиболее распространенным пусковым механизмом окислительного повреждения мембранных белков является реакция сульфгидрильных (SH) групп аминокислоты цистеина со свободными радикалами. При этом образуются радикалы с локализацией неспаренного электрона около атома серы (-S.), которые затем взаимодействуют друг с другом с образованием дисульфидов. Результатом окисления аминокислот может быть нарушение вторичной и третичной структуры белков, облегчающее дальнейшее окисление аминокислотных остатков, и денатурация белковых молекул, в результате чего нарушаются их функции, в частности инактивируются ферменты. Развитие окислительного стресса и гипергликемия при СД приводят к неферментному гликированию белков [4, 14]. Как показали результаты исследования при АД наблюдается активирование процесса образования начальных продуктов гликирования — шиффовых оснований (табл. 1).

При взаимодействии глюкозы с белком образуются основания Шиффа, на первой стадии происходит неферментная реакция конденсации между α-амино- или N-концевой группой белка и карбонильной группой восстанавливающего сахара, затем в результате легкообратимой реакции нуклеофильного присоединения достаточно быстро формируется основание Шиффа. При наличии свободных радикалов в среде, из основания Шиффа, могут образовываться продукты распада, такие как глиоксаль и метилглиоксаль, которые легко реагируют с аминосодержащими биополимерами, включая белки и нуклеиновые кислоты, приводя к переходу окислительного стресса в карбонильный [17]. Образование свободнорадикальных продуктов (ГП, МДА, основания Шиффа) контролируются антиоксидантной системой. Важную роль в антиокси-

Таблица 2. **Влияние таурина (50 мг/кг внутрибрюшинно, 20 дней) на активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы и содержания глутатиона в гомогенате печени крыс с аллоксановым диабетом (n = 15, в каждой группе по 20 животных) ($M \pm m$)**

	Глутатионпероксидаза (мкмоль SH) глутатиона/мг белка	Глутатионредуктаза (мкмоль НАДН/мг белка)	Глутатион — GSH (мкмоль/г)
Контроль	3,55 ± 0,15	0,32 ± 0,04	23,70 ± 1,4
Диабет	1,17 ± 0,16*	0,15 ± 0,02*	12,50 ± 1,2*
Введение таурина	2,38 ± 0,17*	0,23 ± 0,30*	20,80 ± 1,3*

* $p < 0{,}001$ по сравнению с контролем.

дантной защите организма играют легкоокисляющиеся пептиды, в состав которых входят SH-содержащие аминокислоты, которые обладают исключительно высокой реакционной способностью, обеспечивая окислительно-восстановительные реакции в клетке. В ходе окислительно-восстановительных реакций, тиоловые группы легко окисляются с образованием, как правило, дисульфидных группировок и вновь регенерируют при их восстановительном расщеплении. Особое место среди этих соединений занимает глутатион — тиолсодержащий трипептид, образованный аминокислотами: цистеином, глутаминовой кислотой и глицином. Глутатион в комплексе с глутатионпероксидазой и глутатионредуктазой образует систему, которая играет важную роль в регуляции метаболических процессов в клетках, основной функцией данных ферментов является восстановление гидроперекисей до спиртов [7].

Как показали результаты исследования при АД наблюдается понижение содержания глутатиона и активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в гомогенате печени крыс (табл. 2).

В организме животных и человека глутатион присутствует как в окисленной (GSSG, около 10 % от общего количества), так и восстановленной (GSH) форме. В связи с тем, что снижение уровня глутатиона является одним из ведущих факторов в развитии различных патологических процессов, особое значение вызывают препараты, повышающие содержание глутатиона и активирующие глутатионзависимые реакции. В качестве лечебного препарата была применена аминокислота таурин. Как показали результаты исследований, введение таурина приводило к уменьшению содержания продуктов ПОЛ, частичной нормализации окислительной модификации белков в гомогенате печени крыс с АД. Нам представляется, что протективное действие таурина связано с его влиянием на содержание глутатиона, благодаря наличию в структуре таурина SH-группы, которая обладает ярко выраженными восстановительными свойствами и способностью принимать от различных активных форм кислорода электроны, инактивировать свободные радикалы и сохранять уровень эндогенного глутатиона. Таким образом, можно сделать вывод, что введение таурина крысам с АД приводит к частичной нормализации показателей окислительных процессов в печени.

ВЫВОДЫ

1. При аллоксановом диабете в ткани печени у крыс наблюдается увеличение содержания гидроперекисей на 22 %, МДА — на 14 %, оснований Шиффа — на 10 %, ($p < 0{,}001$), а также снижение содержания глутатиона и понижение активности глутатионсодержащих ферментов (глутатионпероксидаза на 32,95 % и глутатионредуктаза — на 46,87 %, $p < 0{,}001$) в гомогенате печени.

2. Введение таурина в дозе 50 мг/кг внутрибрюшинно в течение 20 дней крысам с аллоксановым диабетом приводит к уменьшению содержания в ткани печени гидроперекисей на 48,46 % и МДА — на 63,9 % ($p < 0{,}001$), а также частичной нормализации концентрации белков с окислительной модификацией и оснований Шиффа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. А. Андреев, Ю. Е. Кушнарева, А. А. Старков, *Биохимия*, № 7, 246 – 264 (2005).
2. А. В. Арутюнян, Е. Е. Дубинина, Н. Н. Зыбина, *Фолиант*, № 104, Санкт-Петербург (2000).
3. П. П. Голиков, Н. Ю. Николаева, И. А. Гавриленко, *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, № 7, 6 – 9 (2000).
4. И. И. Дедов, М. И. Балаболкин, *Мед. акад. журн.*, **6**(3), 3 – 15 (2006).
5. Е. Е. Дубинина, С. О. Бурмистров, Д. Ходов, И. Г. Поротов, *Вопросы мед. химии*, № 41, 24 – 26 (1995).
6. Л. С. Колесниченко, В. И. Кулинский, Н. С. Манторова, Л. А. Шапиро, *Украинский биохим. журн.*, № 1104, 60 – 66 (1990).
7. В. И. Кулинский, Л. С. Колесниченко, *Биомед. химия*, № 55, 365 – 379 (2009).
8. Е. И. Львовская, И. А. Волчегорский, С. Е. Шемяков, Р. И. Лифшиц, *Вопросы мед. химии*, № 4, 92 – 93 (1991).
9. Е. М. Покровская, И. Г. Гордеев, Н. А. Волов, В. А. Кокорин, *Рос. кардиол. журн.*, № 87, 56 – 60 (2011).
10. Ф. Е. Путилина, *Определение содержания восстановленного глутатиона. Методы биохимических исследований*, М. И. Прохорова (ред.), ЛГУ, Ленинград (1982).
11. *Сахарный диабет: диагностика, лечение, профилактика*, И. И. Дедов, М. В. Шестакова (ред.), Медицинское информационное агентство, Москва (2011), 808 с.
12. М. Е. Стаценко, Н. Н. Шилина, А. А. Винникова, *Consilium medicum*, **16**(3), 6 – 11 (2014).
13. W. Abebe, *Life Sci.*, **82**, 279 – 289 (2008); doi: 10.1016 / j.lfs.2007.11.012.
14. Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications?

15. N. Ahmed, P. J. Thornalley, *Diabetes*, *Obesity and Metabolism*, **9**(3), 233 – 245 (2007); doi: 10.1111 / j.1463-1326.2006. 00595.x.
16. G. S. Brown, V. Borutatte, *Free Radic. Biol. Med.*, **33**(11), 1440 – 1450 (2002); doi: 10.1016 / s0891-5849 (02) 01112-7.
17. B. Chakravarti, N. Deb, *Gerontology*, **53**, 128 – 139 (2007); doi: 10.1159 / 000097865.
18. V. V. Davydov, N. M. Dobaeva, A. I. Bozhkov, *Experim. Gerontol.*, **39**, 11 – 16 (2004); doI: 10.1016 / j.exger.2003. 08.009.
19. N. J. Lowry, A. J. Rosenbogh, A. L. Farr, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 – 227 (1951).
20. J. Pfeilschifter, *Kidney Int.*, **61**(3), 809 – 815 (2002); doi: 10.1046 / j.1523-1755.2002.00225.x.

Поступила 14.02.19

THE EFFECT OF TAURINE ON OXIDATIVE PROCESSES IN THE RAT LIVER WITH ALLOXAN-INDUCED DIABETES

L. M. Ovsepyan, A. V. Zanginyan, G. S. Kazaryan, and G. V. Zakharyan

Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences of Armenia, Hasratyan str. 7, 0014 Yerevan, Armenia

Results of our study showed activation of the free-radical oxidation processes, decrease in the content of glutathione, and decrease in the activity of glutathione-containing enzymes (glutathione peroxidase by 32.95%, and glutathione reductase by 46.87%, $p < 0.001$) in the total liver homogenate in rats. Analysis of the levels of oxidative modification of proteins and nitric oxide showed increase in their content by 16 and 26% ($p < 0.01$), respectively, in the liver of rats with alloxan diabetes. The introduction of taurine at a dose of 50 mg/kg intraperitoneally for 20 days leads to a decrease in the content of hydroperoxides in the liver tissue by 48.46% and MDA by 63.9% ($p < 0.001$), as well as to partial normalization of the concentration of proteins with oxidative modification and Schiff bases.

Keywords: alloxan-induced diabetes; free-radical oxidation; taurine; rats.