

ОСОБЕННОСТИ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ РОНКОЛЕЙКИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

Супрун Э.В., Терещенко С.В., Губченко Т.Д.

Национальный фармацевтический университет, Украина, г. Харьков, Украина

Последние годы глобальной медико-социальной проблемой является сахарный диабет (СД), который входит в число 7 главных причин смертности населения в большинстве стран мира и занимает третье место среди непосредственных причин смерти после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний [1]. Специалисты отмечают также неуклонный рост распространенности СД – в Украине за последние 10 лет количество больных сахарным диабетом увеличилось более чем в 1,5 раза и составляет около 1 млн. человек, поэтому решение проблем терапии СД поставлено на уровень государственных задач [2]. В настоящее время во всем мире накоплены доказательства того, что эффективный контроль диабета может свести к минимуму развитие многих связанных с ним осложнений, в том числе неврологических, которые и определяют продолжительность жизни больного и его работоспособность (энцефалопатии, дистальные невропатии, преходящие нарушения мозгового кровообращения, инсульт). Относительный риск развития инсульта у лиц с СД 2 типа в 1,8–6 раз выше по сравнению с лицами без СД [3].

Высокая частота осложнений СД обусловлена нарушениями тканевого метаболизма с масштабным повреждением микрокапиллярного русла органов, что приводит к формированию мультиорганной патологии. При этом на фоне типичных нарушений микроциркуляции происходит постишемическое повреждение ткани мозга – развивается энергетический дефицит, формируется глутамат-кальциевый каскад с чрезмерным внутриклеточным накоплением ионов Ca^{2+} и явлениями эксайтотоксичности, лактат-ацидоз и отек мозга, развитие оксидативного стресса и гибель клеток путем некроза или апоптоза [4]. Оксидативный стресс характеризуется интенсификацией процессов свободно-радикального окисления на фоне снижения активности системы антиоксидантной системы (в том числе ферментативной глутатионпероксидазной/глутатионредуктазной (ГП/ГПР) системы), при этом АФК «атакуют» белки, липиды и нуклеиновые кислоты клеток и вызывают их окислительную модификацию. Поэтому главной задачей эффективной терапии СД является блокирование взаимообусловленных механизмов прогрессирования СД – сосудистых, метаболических и феномена оксидативного стресса, в связи с чем все большее внимание уделяется препаратам с антиоксидантным действием.

В настоящее время во всем мире накоплены доказательства того, что эффективный контроль диабета может свести к минимуму развитие многих связанных с ним осложнений, в том числе неврологических, которые и определяют продолжительность жизни больного и его работоспособность (энцефалопатии, дистальные невропатии, преходящие нарушения мозгового кровообращения, инсульт). К веществам, обеспечивающим в очаге ишемии/гипоксии как повреждающее действие, так и систему жизнеспособности клеток, относятся цитокины – трансмиттеры межклеточного взаимодействия, которые формируют сеть

коммуникативных сигналов между клетками иммунной системы и клетками других органов и тканей [5]. Следовательно, эффективным перспективным звеном в комплексной терапии постишемических неврологических осложнений при СД может стать применение цитокиновых препаратов.

Цель исследования – изучение динамики показателей глутатионпероксидазной/глутатионредуктазной системы, энергетического метаболизма и окислительной модификации белка (ОМБ) в тканях головного мозга крыс с экспериментальным СД при применении церебропротектора метаболического действия тиоцетама и цитокинового препарата – рекомбинантного IL-2 (Ронколейкина).

Материалы и методы. Исследования проводились на 4 группах (по десять животных в каждой) белых крысах линии Вистар (250-300г.). Первая группа – интактные животные, вторая – животные с экспериментальным сахарным диабетом (СД, контроль), третья – животные с СД, которым вводили тиоцетам в дозе 500 мг/кг внутримышечно 1 раз в сутки (группа СД+Тиоцетам); четвертая – животные с СД, которым вводили Ронколейкин в дозе 0,01 мг/кг внутримышечно 1 раз в сутки (группа СД+Ронколейкин). Животным первой и второй групп в соответствующем объеме внутримышечно вводили стерильный физиологический раствор. Экспериментальный диабет моделировали с помощью однократного подкожного введения водного раствора аллоксана моногидрата (Sigma, США) в дозе 150 мг/кг в виде 5% раствора в ацетатном буфере, рН 4,5. Введение данного вещества осуществляли после предварительной 24-часовой депривации пищи, при сохраненном доступе к воде. Уровень глюкозы крови определялся на 3 сутки после введения аллоксана с помощью глюкометра Optium Omega (Abbot Diabetes Care Inc., США). Для последующих исследований использованы только животные с повышенным уровнем глюкозы (>11 ммоль/л). Материалом для биохимических исследований явились фрагменты ткани головного мозга, находящиеся в области средне-мозговой артерии и гомогенизированные в жидком азоте. Для изучения активности системы глутатиона в гомогенате головного мозга крыс определяли уровни восстановленного и окисленного глутатиона, активность глутатионпероксидазы (ГП) и глутатионредуктазы (ГПР), содержание продуктов окислительной модификации белка по уровню альдегидных (АФГ) и карбоксильных (КФГ) продуктов. Для оценки процессов углеводно-энергетического обмена и окисления в цикле Кребса в гомогенате мозга определяли уровень адениловых нуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ). Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований при формировании аллоксанового диабета было установлено нарушение системы глутатиона и отмечена выраженная диспропорция – повышение относительно контрольных показателей уровней окисленных форм глутатиона в 2,7 раза ($p < 0,001$) на фоне резкого снижения восстановленных форм глутатиона.

Суммарные показатели окисленных (GSSG) и восстановленных (GSH) форм глутатиона и содержание альдегидных (АФГ) и карбоксильных (КФГ) продуктов в тканях головного мозга крыс с аллоксановым диабетом ($M \pm m$) (n=10)

Группа животных	GSSG, мкМ /г/белка	GSH, мкМ /г/белка	АФГ, у.е./г/белка	КФГ, у.е./г/белка
Интакт	0,27±0,03	4,49±0,38	1,49±0,16	1,01±0,09
СД	0,75±0,06*	0,56±0,06*	3,44±0,39*	2,26±0,15*
СД+Тиоцетам	0,46±0,05* ^К	0,71±0,06* ^К	2,48±0,22* ^К	1,44±0,15* ^К
СД+Ронколейкин	0,38±0,03* ^{КТ}	2,45±0,24* ^{КТ}	1,84±0,19* ^{КТ}	1,47±0,06* ^К

Примечание: здесь и в таблице 2 – ₁Интакт – интактные крысы; ₂СД – сахарный диабет; ₃СД+Тиоцетам – сахарный диабет + Тиоцетам; ₄СД+Ронколейкин – сахарный диабет + Ронколейкин.

В гомогенате мозга экспериментальных животных развитие СД сопровождалось также стабильным снижением активности энзимов тиол-дисульфидной системы – ГП на 76% ($p < 0,001$) и ГПР на 79% ($p < 0,001$) по сравнению с группой интактных животных (рис.1).

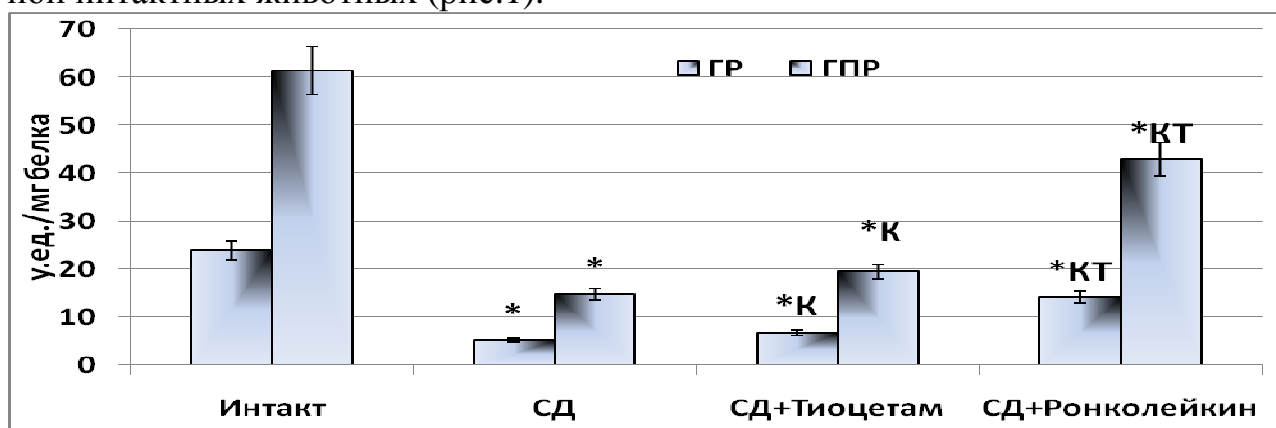


Рис. 1. Активность глутатионпероксидазы (ГП) и глутатионредуктазы (ГПР) в тканях головного мозга крыс с СД. Примечание к рис.1-2: Интакт – интактные крысы; СД – сахарный диабет; СД+Тиоцетам – сахарный диабет + Тиоцетам; СД+ Ронколейкин – сахарный диабет + Ронколейкин. Статистически достоверные отличия ($p < 0,05$) относительно интактных крыс отмечены знаками «И», относительно крыс с сахарным диабетом – знаками «К», относительно крыс группы СД+Тиоцетам – знаками «Т».

Также отмечено увеличением в гомогенате мозга маркеров ОМБ, которые образуются в условиях оксидативного и нитрозирующего стресса – альдегидфенилгидразонов (АФГ) и кетонфенилгидразонов (КФГ) – в 2,2 и 2,3 раза соответственно (табл.1).

Отмечен дисбаланс пула макроэргических фосфатов в ткани мозга контрольных животных (табл.2) – снижение уровней АТФ и АДФ соответственно на 70% и 71%. Уровень АМФ в контрольной группе достоверно отличался от уровней интактных животных – был выше на 89%, что адекватно снижению в эти периоды АТФ и, возможно, отражает его усиленный распад на фоне ишемического повреждения.

Показатели энергетического метаболизма (АТФ, АДФ, АМФ) в тканях головного мозга крыс с аллоксановым диабетом ($M \pm m$) (n=10)

Группа животных	АТФ, мкмоль/г ткани	АДФ, мкмоль/г ткани	АМФ, мкмоль/г ткани
Интакт	3,62±0,17	0,43±0,01	0,10±0,01
СД	1,09±0,12*	0,13±0,01*	0,19±0,02*
СД+Тиоцетам	1,77±0,17* ^К	0,16±0,02* ^К	0,13±0,01* ^К
СД+ Ронколейкин	2,59±0,18* ^{КТ}	0,32±0,03* ^{КТ}	0,11±0,01 ^К

На фоне введения Тиоцетама у экспериментальных животных отмечено ингибирование образования окисленных форм глутатиона на 39% на фоне увеличения его восстановленных форм на 27% и повышения активности ГР и ГПР на 32-37% относительно контрольных показателей (рис.1, табл.1-2), снижение маркеров ОМБ, особенно КФГ (на 36%), стабилизация энергетических показателей тканей мозга экспериментальных животных – снизились показатели АМФ на 30%, повысились уровни АТФ и АДФ соответственно на 62% на 30%, однако сохранились достоверные отличия этих показателей от интактных.

Введение Ронколейкина животным с СД оказало наиболее выраженное влияние на состояние системы глутатиона – уровни окисленных форм глутатиона снизились в 2 раза по сравнению с контрольными. При этом активно повышаются уровни восстановленных форм глутатиона и восстанавливается активность энзимов ГР/ГПР системы – повышается почти в 4 раза ($p < 0,001$) и достоверно превышает эффект тиоцетама. Курсовое введение Ронколейкина способствовало стабилизации окислительной модификации белков и снижению их маркеров в ткани головного мозга соответственно на 47% та 35% ($p < 0,01$). Применение Ронколейкина при постишемическом повреждении ткани мозга при АСД на фоне выраженного снижения АМФ (на 53%) привело к стабильному повышению относительно контрольной группы уровней АТФ и АДФ в 2,5 раза.

Выводы

1. Постишемическое поражение ткани головного мозга крыс на модели аллоксан-индуцированного диабета сопровождалось дискордантными сдвигами равновесия системы глутатиона, пула макроэргических фосфатов и увеличением в гомогенате мозга маркеров окислительной модификации белков.

2. Курсовое применение тиоцетама и Ронколейкина способствовало восстановлению энергетического метаболизма и снижению активности реакций свободно-радикального окисления в тканях головного мозга крыс с СД, максимальная активность отмечена у Ронколейкина.

Литература

1. Nathan D.M. American Diabetes Association; European Association for the Study of Diabetes. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy. A consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes /

D.M. Nathan, J.V. Buse, M.V. Davidson [et al.] // *Diabetes Care*. – 2009. – Vol. 32. – P. 193-203.

2. Дедов И.И. Сахарный диабет: развитие технологий в диагностике, лечении и профилактике (пленарная лекция) / И.И. Дедов // *Сахарный диабет*. — 2010. — № 3 (48). — С. 6-13.

3. Аметов А.С. Сахарный диабет. Проблемы и решения. Руководство. — М., 2011. — 680 с.

4. Манухина Е.Б. Защищающие и повреждающие эффекты периодической гипоксии: роль оксида азота / Е.Б. Манухина, Х.Ф. Дауни, Р.Т. Маллет [и др.] // *Вестник РАМН*. – 2007. – № 2. – С. 27-33.

5. Fujinami, R.S. Reviews in neuroimmunology. [Text] / R.S. Fujinami // *J Neurovirol*. – 2014. – Vol. 20 (№ 2). – P. 105-116.