

© Коллектив авторов, 2012

**ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК, АКТИВНОСТИ
АКОНИТАТГИДРАТАЗЫ И УРОВНЯ ЦИТРАТА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ
2 ТИПА У КРЫС И ВВЕДЕНИИ МЕЛАТОНИНА**

*А.А. Агарков, Т.Н. Попова, Л.В. Матасова, С.С. Попов,
И.Ю. Искусных, Е.И. Склярова*

Воронежский государственный университет, г. Воронеж

При развитии сахарного диабета 2 типа (СД2) у крыс наблюдается фрагментация ДНК, выделенной из печени экспериментальных животных. Выявлено также, что в условиях данной патологии снижается активность аконитатгидратазы (АГ, КФ 4.2.1.3), как в печени, так и в сыворотке крови по сравнению с показателями, полученными у крыс контрольной группы. Наряду с этим возрастает уровень цитрата в исследуемых тканях. Введение мелатонина способствовало изменению исследованных параметров в сторону нормы, что, вероятно, связано с реализацией его антиоксидантного потенциала.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, эксперимент, ДНК, мелатонин.

В настоящее время всё возрастающее значение среди неинфекционных заболеваний приобретает сахарный диабет [1]. Хроническая гипергликемия, являющаяся основным и объективным признаком наличия этого заболевания, тесно связана с развитием оксидативного стресса [15], который вызывает дисфункцию эндотелия и, таким образом, играет ключевую патогенетическую роль в развитии острых осложнений данной эндокринопатии.

Известно, что ионы металлов переменной валентности, в частности Fe^{2+} , способствуют образованию гидроксильного радикала в реакции Фентона и Хабер-Вайса и усиливают свободнорадикальное окисление (СО) биомолекул. В качестве хелатора ионов железа может выступать цитрат [14]. Благодаря наличию в его структуре трех карбоксильных групп цитрат может эффективно связывать ионы металлов. Реакцию превращения цитрата в изоцитрат катализирует аконитатгидратаза (АГ, КФ 4.2.1.3). Молекула данного фермента легко разрушается активными формами кислорода (АФК), что позволяет рассматривать данный фермент как критиче-

скую мишень действия свободных радикалов (СР) [10]. Уменьшая выраженность окислительного стресса с помощью антиоксидантной терапии, теоретически можно не только замедлить прогрессирование диабетических сосудистых осложнений, но и снизить резистентность клеток к инсулину, способствуя тем самым лучшей компенсации нарушенного углеводного обмена [5]. Имеются данные, что мелатонин может выступать как перехватчик гидроксильного радикала, синглетного кислорода, оксида азота [3]. Кроме этого, гормон обладает способностью непосредственно связывать ионы металлов с переменной валентностью, которые проявляют в организме прооксидантное действие [4].

Поскольку активные метаболиты кислорода также способны повреждать генетический аппарат клеток путем формирования разрывов ДНК, ее деградации и потери клеткой части генетического материала, то представляет интерес исследование протекторного действия мелатонина, обладающего липофильными свойствами и способного беспрепятственно проникать в ядро. В прямых экспериментах

на культуре клеток и в опытах на животных показано, что данный гормон проявляет антиапоптотические свойства [12].

Цель исследования – изучить влияние мелатонина на степень фрагментации ДНК, активность АГ и уровень цитрата в гепатоцитах печени в эксперименте на крысах с СД2 типа.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали белых крыс-самцов (*Rattus rattus* L.) массой 150-200 г. СД2 индуцировали внутримышечным введением протамин-сульфата в течение 3-х недель в дозе 10 мг/кг массы тела животного в объеме 0,5 мл 0,85% раствора NaCl, 3 раза в сутки [8]. Животных умерщвляли под наркозом. Печень извлекали после перфузирования ледяным раствором натрия хлорида со скоростью 5 мл/мин в течение 5 мин. Навеску печени крысы гомогенизировали в 4-кратном объеме охлажденной среды выделения следующего состава: 0,1 М трис-HCl-буфер (pH 7,8), содержащий 1 мМ ЭДТА, 1% β-меркаптоэтанол. Гомогенат центрифугировали при 10000 г в течение 12 мин. Полученный супернатант использовали для исследования. Венозную кровь выдерживали 0,5 часа при 37 °С, затем центрифугировали при 2500g в течение 15 мин. Полученную сыворотку использовали для дальнейшего исследования.

Животные были разделены на 3 экспериментальные группы: 1-ую группу (контроль; n=12) составляли животные, содержащиеся в условиях стандартного режима вивария; во 2-й группе (n=10) у крыс индуцировали сахарный диабет 2-го типа при помощи внутримышечного введения протамин-сульфата в дозе 10 мг/кг по [8]; в 3-й группе (n=10) животным с СД2 внутрибрюшинно вводили мелатонин в дозе 2 мг/кг массы тела в объеме 1 мл 0,85% раствора NaCl на 15 сутки после начала индуцирования СД2, трехкратно с интервалом в один день. На 21-е сутки после начала эксперимента осуществляли забор биоматериала для исследований.

Фрагментацию ДНК, выделенной фенольно-хлороформным методом [7], выяв-

ляли путем проведения электрофореза образца ДНК в агарозном геле с использованием буфера трис-ацетат-ЭДТА (ТАЕ). Активность АГ определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Hitachi U1900 с программным обеспечением при 233 нм. О скорости дегидратации цитрата в ходе АГ реакции судили по возрастанию оптической плотности в результате образования двойной связи в молекуле *цис*-аконитата. Для определения активности АГ использовали среду следующего состава: 50 мМ трис-HCl-буфер, pH 7,8, содержащий 0,15 мМ цитрат. Количество цитрата определяли по методу Нательсона [2]. Данные обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента, различия считали достоверными при p<0,05.

Результаты и их обсуждение

ДНК, выделенная из печени крыс с СД2, была фрагментирована, как видно на рис.1, по сравнению с ДНК контрольных проб. По мнению ряда исследователей, подобные фрагменты возникают при действии апоптоз-специфических нуклеаз [11]. Введение мелатонина животным с СД2 приводило к снижению степени фрагментации ДНК (рис.1), что может быть свидетельством антиапоптотического действия мелатонина. Снижение интенсивности апоптоза в гепатоцитах, очевидно, было взаимосвязано с уменьшением скорости процессов СО.

Известно, что одной из чувствительных мишеней действия СР является АГ, выполняющая основную роль в регуляции аккумуляции цитрата [10]. Показано, что в условиях активации СО происходит угнетение активности фермента и накопление цитрата, являющегося низкомолекулярным антиоксидантом вследствие хелатирующих его свойств по отношению к ионам Fe²⁺ [9]. Ионы Fe²⁺, как известно, обладают прооксидантной активностью [6].

Результаты проведенных исследований показали, что при СД2 у крыс происходит увеличение содержания цитрата в 2,3 раза в печени и в 2,7 раза в сыворотке крови (рис. 2) по сравнению с контрольными значениями.

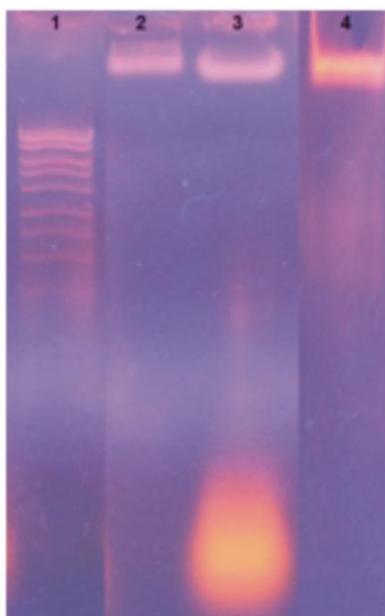


Рис. 1. Фрагментация ДНК в печени крыс:
1 – маркеры; 2 – контрольная группа; 3 – при сахарном диабете 2-го типа,
4 – при введении мелатонина животным с патологией (СД2)

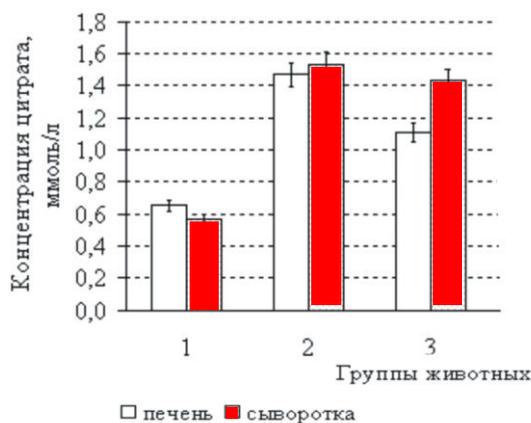


Рис. 2. Концентрация цитрата в печени и сыворотке крови крыс:
1 – контрольная группа; 2 – при сахарном диабете 2-го типа,
3 – при введении мелатонина животным с патологией (СД2)

Полученные результаты согласуются с данными литературы о том, что при патологических состояниях, сопряженных с оксидативным стрессом, происходит нарушение утилизации цитрата [13]. При

этом наблюдалось снижение удельной активности АГ в печени крыс с СД2 в 1,9 раза (рис.3 (I)), в сыворотке крови в 2,8 раза (рис.3(II)) относительно контроля.

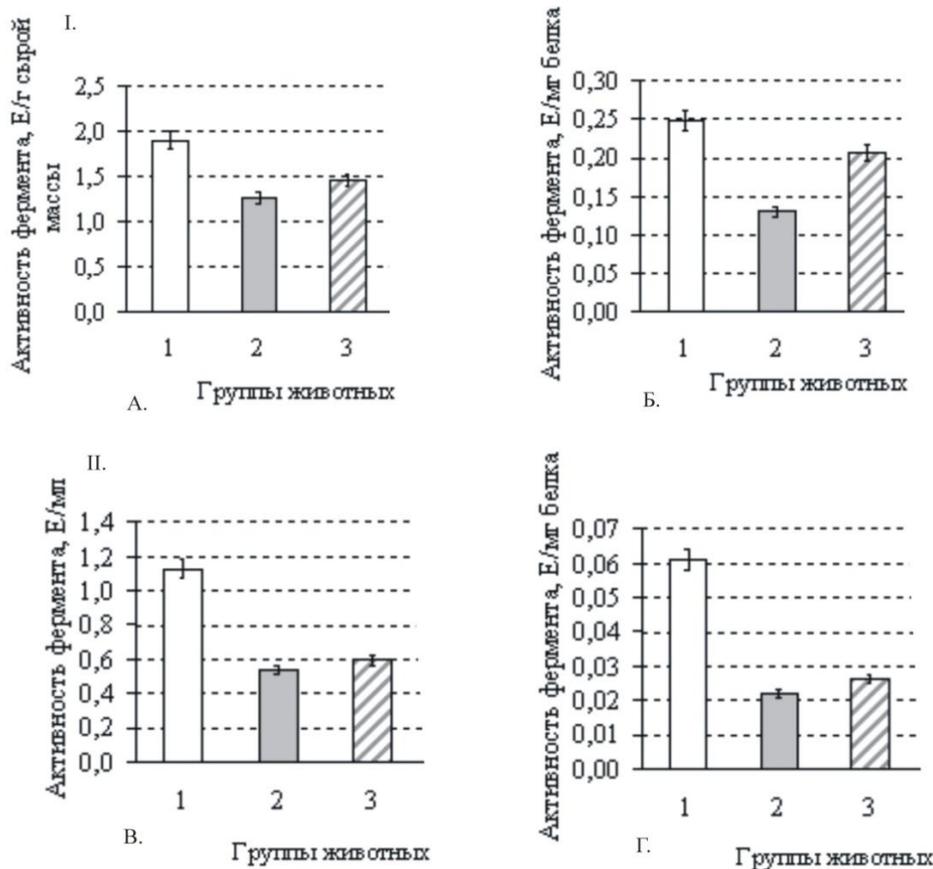


Рис. 3. Активность аконитатгидратазы

(I) – в печени крыс, (II) – в сыворотке крови крыс

1 – контрольная группа животных; 2 – при сахарном диабете 2-го типа;

3 – при введении мелатонина животным с патологией

Известно, что активность АГ может служить маркером степени развития оксидативного стресса, так как под действием АФК фермент теряет активность вследствие окислительной модификации активного центра, связанной с высвобождением атома железа из железо-серного кластера [10].

При введении мелатонина крысам с СД2 концентрация цитрата снижалась в печени и сыворотке крови крыс соответственно в 1,5 и 1,8 раза по сравнению с животными второй группы (рис.2). Наряду с этим, при введении мелатонина было вы-

явлено увеличение удельной активности АГ в печени и сыворотке крови по сравнению со значениями при патологии (СД2). Так, удельная активность АГ при действии мелатонина возрастала в печени и сыворотке крови крыс соответственно в 1,5 и 2,1 раза (рис.3(I, II)). Модификации активности АГ, выраженной в Е/г сырой массы печени и Е/мл сыворотки, демонстрировали ту же тенденцию, что и удельная активность фермента (рис.3(I, II)). Изменение исследуемых параметров в сторону контрольных значений при введении мелатонина животным с СД2, очевидно, свиде-

тельствует о снижении уровня окислительного стресса, что ведет к реконструкции активного центра АГ и утилизации цитрата в катализируемой АГ реакции.

Таким образом, мелатонин-опосредованное восстановление активности АГ, выступающей в качестве критической мишени действия СР при патологии и, как следствие, нормализация концентрации цитрата, а также снижение степени фрагментации ДНК, могут указывать на способность мелатонина оказывать позитивное регулирующее воздействие на свободнорадикальный гомеостаз, что приводит к уменьшению степени проявления оксидативного стресса при СД2.

Выводы

1. Развитие сахарного диабета 2 типа у крыс сопровождалось фрагментацией ДНК, снижением активности аконитатгидратазы и, как следствие, увеличением уровня цитрата как в печени, так и в сыворотке крови.

2. Введение мелатонина животным с сахарным диабетом типа 2 сопровождалось нормализацией исследуемых параметров, что, вероятно, было обусловлено антиоксидантными свойствами данного гормона.

Литература

1. Осложнения сахарного диабета: руководство / М.Б. Анциферов [и др.]; под ред. И.И. Дедова. – М., 1995. – 40 с.
2. Афанасьев В.Г. К микрометоду определения лимонной кислоты в сыворотке крови с помощью фотоэлектроколориметра / В.Г. Афанасьев, В.С. Зайцев, Т.И. Вольфсон // Лаб. дело. – 1973. – №4. – С. 115-116.
3. Барабой В.А. Антиокислительная и биологическая активность мелатонина / В.А. Барабой // Украинский биохим. журн. – 2000. – Т. 73, №3. – С. 5-11.
4. Каладзе Н.Н. Итоги и перспективы изучения физиологических, патогенетических и фармакологических эффектов мелатонина / Н.Н. Каладзе, Е.М. Соболева, Н.Н. Скоромная // Журнал «Здоровье ребенка». – 2010. – Т. 2, №23. – С. 156-166. – Электрон. дан. – Режим доступа: <http://pediatric.mif-ua.com/archive/issue-12604/article-12766/>
5. Кузина И.В. Диабетическая невропатия. Современные тенденции антиоксидантной терапии / И.В. Кузина, И.В. Гурьева // Трудный пациент. – 2008. – №5-6. – С. 15-20.
6. Кухтина Е.Н. Влияние железа, цинка, меди на процессы перекисного окисления липидов / Е.Н. Кухтина, Н.Н. Глущенко // Биохимия. – 1996. – Т. 61, №6. – С. 993-997.
7. Маниатис Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич., Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 478 с.
8. Ульянов А.М. Инсулярная система животных при хроническом дефиците гепарина / А.М. Ульянов, Ю.А. Тарасов // Вопросы медицинской химии. – 2000. – Т. 46, № 2. – С. 149-154.
9. Donnes recentes sur metabolisme du fer: un etat de transition / E. Cadet [et al.] // La revue de medecine interne. – 2005. – Vol. 26. – P. 315-324.
10. Gardner P.R. Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs / P.R. Gardner, D.M. Nguyen, C.W. White // Proc. Nat. Acad. Sci. – 1994. – Vol. 91, №25. – P. 12248-12252.
11. Muller K. Gpl20 of HIV-1 induces apoptosis in rat cortical cell cultures: prevention by memantine / K. Muller // Eur. J. Pharmacol. – 1992. – Vol. 226, №6. – P. 209-214.
12. An assessment of the antioxidant and antiamyloidogenic properties of melatonin: implications for Alzheimer's disease / M.A. Pappolla [et al.] // J. Neural. Transm. – 2000. – Vol. 107. – P. 203-231.
13. Rafalowska U. The effect of aspartate on citrate metabolism in the cytosolic fraction of brain under conditions of normoxia, hypoxia and anesthesia / U. Rafalowska, M. Erecinska, B. Chance // J. Neurochem. – 1975. – Vol. 25, №4. – P. 497-501.
14. Skulachev V.P. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants / V.P. Skulachev //

Quant. Rev. Biophys. – 1996. – Vol. 29.
– P. 169-203.
15. Oxidative stress in the pathogenesis of

diabetic neuropathy / A.M. Vincent [et al.] // Endocr. Rev. – 2004. – Vol. 25, №4. – P. 612-628.

**ESTIMATION OF DNA FRAGMENTATION, ACONITASE ACTIVITY
AND CITRATE LEVEL UNDER TYPE 2 DIABETES AT RAT
AND INTRODUCTION OF MELATONIN**

*A.A. Agarkov, T.N. Popova, L.V. Matasova, S.S. Popov,
I.Y. Iskusnykh, E.I. Sklyarova*

Fragmentation of DNA from rat liver under type 2 diabetes has been observed. Furthermore, aconitase (EC 4.2.1.3) activity in rat liver and blood under this pathology is decreased in comparison with control group. Along with this fact the level of citrate in researching tissues is increased. Changes investigating parameters towards norm at introduction of melatonin were established, that is connected probably with realization of antioxidant action of the hormone.

Key words: diabetes mellitus type 2, experiment, DNA, melatonin.

Агарков Александр Алексеевич – к.б.н., ассистент кафедры медицинской биохимии и микробиологии биолого-почвенного факультета ВГУ.
394006, г. Воронеж, Университетская пл., 1.
E-mail: agalalek@mail.ru.

Попова Татьяна Николаевна – д.б.н., проф., зав. кафедрой медицинской биохимии и микробиологии биолого-почвенного факультета ВГУ.
394006, г. Воронеж, Университетская пл., 1.
E-mail: popova@bio.vsu.ru.

Матасова Лариса Владимировна – д.б.н., доцент кафедры медицинской биохимии и микробиологии биолого-почвенного факультета ВГУ.
394006, г. Воронеж, Университетская пл., 1.
E-mail: popova@bio.vsu.ru.

Попов Сергей Сергеевич – к.м.н., ассистент кафедры эндокринологии лечебного факультета ВГМА.
394006, г. Воронеж, Университетская пл., 1.
E-mail: popova@bio.vsu.ru.

Искусных Игорь Юрьевич – аспирант кафедры медицинской биохимии и микробиологии биолого-почвенного факультета ВГУ.
394006, г. Воронеж, Университетская пл., 1.
E-mail: popova@bio.vsu.ru.

Склярова Екатерина Ильинична – магистрант кафедры медицинской биохимии и микробиологии биолого-почвенного факультета ВГУ.
394006, г. Воронеж, Университетская пл., 1.
E-mail: popova@bio.vsu.ru.