

## ВЛИЯНИЕ СТАТИНОВ НА АКТИВНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ГИДРОЛАЗ ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ ДИАБЕТЕ

*А.С. Полупанов*

Рязанский государственный медицинский университет  
имени академика И.П. Павлова

**В статье показано, что при аллоксановом диабете у крыс повышается неседиментируемая активность лизосомальных гидролаз в печени, миокарде и скелетной мышце на фоне снижения седиментируемой активности. Ловастатин и симвастатин способствуют уменьшению выраженности данных процессов у крыс с аллоксановым диабетом.**

**Ключевые слова:** аллоксановый диабет, эксперимент, лизосомальные гидролазы

С каждым годом гиполипидемические средства группы статинов все активнее внедряются в медицинскую практику. В настоящее время статины занимают более 90% рынка антиатеросклеротических препаратов [6]. Основными направлениями их использования являются наследственные дислипидемии, кардиологическая и эндокринная патологии. Столь широкое применение статинов связано с их высокой эффективностью в предотвращении атеросклероза и снижении риска развития его осложнений, что неоднократно показано в многоцентровых клинических исследованиях [11]. Установлено, что статины значительно снижают кардиальную и общую смертность [2], оказывают благоприятное влияние на прогноз больных сахарным диабетом. Положительное действие статинов реализуется как за счет основного механизма – ингибирования ключевого фермента синтеза холестерина – 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктазы [8], так и за счет наличия у препаратов дополнительных терапевтических эффектов, носящих название плеiotропных. К таким эффектам относят способность устранять эндотелиальную дисфункцию, оказывать антиишемическое, антиаритмическое, противовоспалительное действие [3]. Кроме этого, имеются данные о том, что статины облегчают контроль гликемии у больных сахарным диабетом [1]. Механизмы развития плеiotропных эффектов статинов окончательно не установлены, однако предполагают, что они могут быть связаны с подавлением статинами синтеза некоторых биологически активных продуктов метаболизма мевалоновой кислоты, таких как фарнезилпирофосфат, геранилгеранилпирофосфат, которые играют значительную роль в регуляции экспрессии ряда генов и активности многих ферментов. Также определенное значение придается антиоксидантным свойствам статинов.

Известно, что лабильность мембран лизосом, проявляющаяся ростом неседиментируемой активности лизосомальных ферментов на фоне снижения седиментируемой активности, характерна для патогенеза многих заболеваний, она также отражает повреждающее действие ряда лекарственных средств на субклеточном уровне.

В связи с вышеизложенным целью работы является изучить влияние статинов на проницаемость лизосомальных мембран в условиях аллоксанового диабета – патологии, основным патогенетическим звеном которой является резкая стимуляция процессов ПОЛ, приводящая к тяжелому повреждению мембран клеток и органелл.

### **Материалы и методы**

Исследование проводилось на 28 половозрелых нелинейных белых крысах самцах массой 150-220 г. Экспериментальный диабет моделировали однократным внутримышечным введением 5% водного раствора аллоксана в дозе 125 мг/кг массы после их предварительного 24 часового голодания. Взятие крови из хвостовой вены проводили на 3-е сутки после инъекции аллоксана. В опыт брали животных с уровнем гликемии более 13 ммоль/л. Содержание глюкозы крови определяли глюкозооксидазным методом с использованием набора реактивов фирмы LACHEMA (Чехия). Препараты вводили внутривенно ежедневно в 18 часов в течение 14 дней, начиная с первого дня развития патологии: ловастатин в дозе 20 мг/кг, симвастатин в дозе 24 мг/кг, контрольным животным вводили дистиллированную воду. На 14 день развития патологии животных этаназировали под эфирным наркозом. У крыс забирали печень, сердце и бедренную мышцу, органы отмывали в физиологическом растворе и гомогенизировали на холоде в

гомогенизаторе Heidolph D1AX 900 (Германия) при 24000 об/мин в течение 60 сек в 0,25М растворе сахарозы, содержащем 1мМ ЭДТА. Затем гомогенат центрифугировали при 3000 об/мин. в течение 10 минут при 4°C, осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость повторно центрифугировали при 20000 об/мин в течение 30 минут при 4°C. Осадок повторно ресуспендировали в 0,25М растворе сахарозы, содержащем 0,1% тритон XI00.

Активность  $\beta$ -галактозидазы, катепсина Д и ДНК-азы определяли в надосадке (неседиментируемая активность) и в осадке, содержащем лизосомы (седиментируемая активность), спектрофотометрическим методом по гидролизу  $\beta$ -D-галактопиранозида [9], гемоглобина [12] и ДНК [9] соответственно. Активность  $\beta$ -галактозидазы выражали в нмоль п-нитрофенола/мг белка в минуту, катепсина Д – в нмоль тирозина/мг белка в минуту, ДНК-азы – в нмоль 5 АМФ/мг белка в минуту. Результаты обработаны методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

### Результаты и их обсуждение

Неседиментируемая и седиментируемая активности лизосомальных катепсина Д,  $\beta$ -галактозидазы и ДНК-азы в печени, миокарде и скелетной мышце у интактных животных представлены в таблице 1.

На 14 день развития экспериментального диабета неседиментируемая активности катепсина Д в печени, миокарде и скелетной мышце повысилась на 201,0% ( $p<0,001$ ), 260,6% ( $p<0,001$ ) и 141,1% ( $p<0,001$ ) соответственно, неседиментируемая активность  $\beta$ -галактозидазы увеличилась на 183,8% ( $p<0,001$ ), 227,8% ( $p<0,001$ ) и 110,6% ( $p<0,001$ ) соответственно, неседиментируемая активность ДНКазы повысилась на 221,1% ( $p<0,001$ ), 212,2% ( $p<0,001$ ) и 288,5% ( $p<0,001$ ) соответственно.

На 14 сутки аллоксанового диабета седиментируемая активность катепсина Д понизилась в печени на 48,6% ( $p<0,001$ ), в миокарде на 38,7% ( $p<0,05$ ), в скелетной мышце на 40,2% ( $p<0,01$ ). Седиментируемая активность  $\beta$ -галактозидазы в печени снизилась на 55,8% ( $p<0,01$ ), в миокарде и скелетной мышце достоверно не изменилась. Седиментируемая активность ДНКазы в печени, миокарде и скелетной мышце уменьшилась на 46,6% ( $p<0,001$ ), 50,8% ( $p<0,001$ ) и 53,2% ( $p<0,001$ ) соответственно (табл. 1).

На 14 сутки введения ловастатина животным с аллоксановым диабетом неседиментируемая активность катепсина Д понизилась в печени на 15,6% ( $p<0,05$ ), в миокарде на 24,2% ( $p<0,05$ ), в скелетной мышце на 22,1% ( $p<0,05$ ) по сравнению с уровнем активности в контроле диабета; однако, значительно превышала уровень нормы. Седиментируемая активность катепсина Д достоверно не отличалась от показателей в контроле патологии.

По сравнению с данными серии контроля диабета неседиментируемая активность  $\beta$ -галактозидазы при 14 дневном назначении ловастатина животным с экспериментальным диабетом понизилась в печени, миокарде и скелетной мышце на 40,2% ( $p<0,01$ ), 42,4% ( $p<0,01$ ) и 30,9% ( $p<0,05$ ) соответственно, оставаясь выше уровня контроля (интактные животные) во всех исследуемых органах. Седиментируемая активность  $\beta$ -галактозидазы во всех изученных органах от показателей контроля патологии достоверно не отличалась (табл. 1).

Неседиментируемая активность ДНКазы после 14 дневного курса ловастатина на фоне аллоксанового диабета уменьшалась относительно уровня контроля диабета в печени на 15,8% ( $p<0,05$ ), в миокарде на 17,2% ( $p<0,05$ ), в скелетной мышце на 16,9% ( $p<0,05$ ), но сохранялась повышенной по сравнению с контролем (интактные животные). По отношению к контролю патологии седиментируемая активность ДНКазы увеличилась на 27,3% ( $p<0,05$ ) в печени и на 33,3% ( $p<0,05$ ) в миокарде; в скелетной мышце достоверных изменений седиментируемой активности ДНКазы по сравнению с показателями контроля диабета не установлено. Нормализации седиментируемой активности фермента не наблюдалось (табл. 1).

Применение симвастатина на фоне аллоксанового диабета на 14 сутки вызывало снижение неседиментируемой активности катепсина Д по сравнению с контролем диабета в печени на 19,4% ( $p<0,05$ ), в миокарде на 21,6% ( $p<0,05$ ), в скелетной мышце на 21,2% ( $p<0,05$ ). Повышение седиментируемой активности катепсина Д на 32,9% ( $p<0,05$ ) отмечалось только в печени на 14 день использования симвастатина на фоне аллоксанового диабета. Следует отметить, что исследуемые показатели достоверно превышали уровень нормы.

Неседиментируемая активность  $\beta$ -галактозидазы снижалась по сравнению с контролем патологии в печени, миокарде и скелетной мышце на 14 день применения симвастатина на фоне аллоксанового диабета на 45,1% ( $p<0,01$ ), 27,1% ( $p<0,05$ ) и 33,8% ( $p<0,05$ ) соответственно. При этом уровень неседиментируемой активности  $\beta$ -галактозидазы в печени, миокарде и скелетной

мышце на 14 день назначения симвастатина существенно превышал показатели интактных животных.

На 14 день применения симвастатина у животных с аллоксановым диабетом отмечалось снижение неседиментируемой активности ДНКазы по сравнению с контролем диабета в печени, миокарде и скелетной мышце на 19,7% ( $p<0,05$ ), 21,1% ( $p<0,05$ ) и 21,5% ( $p<0,05$ ) соответственно. Нормализации уровня неседиментируемой активности ДНКазы не наблюдалось. Седиментируемая активность ДНКазы превышала показатели контроля диабета в печени на 32,7% ( $p<0,05$ ), в миокарде на 36,6% ( $p<0,05$ ) и в скелетной мышце на 50,0% ( $p<0,05$ ), но не достигала уровня нормы.

Таблица 1

**Активность лизосомальных ферментов в тканях у интактных животных, животных с аллоксановым диабетом и при курсовом применении ловастатина и симвастатина на фоне аллоксанового диабета**

| Фермент   |     | Печень<br>n=7  | Миокард<br>n=7 | Скелетная мышца<br>n=7 |
|---|-----|----------------|----------------|------------------------|
| Контроль (интактные животные)                                   |     |                |                |                        |
| Катепсин Д  | СА  | 1,42±0,05      | 0,31±0,02      | 0,87±0,02              |
|   | НСА | 2,04±0,02      | 1,09±0,10      | 0,90±0,03              |
| β-галактозидаза   | СА  | 0,86±0,09      | 0,020±0,003    | 0,015±0,003            |
|   | НСА | 1,36±0,11      | 0,18±0,03      | 0,66±0,04              |
| ДНКаза  | СА  | 1,03±0,05      | 1,89±0,04      | 0,94±0,04              |
|   | НСА | 0,57±0,03      | 0,82±0,02      | 0,61±0,02              |
| Аллоксановый диабет (14 день)                                   |     |                |                |                        |
| Катепсин Д  | СА  | 0,73±0,06 *    | 0,19±0,03 *    | 0,52±0,07*             |
|   | НСА | 6,14±0,21*     | 3,93±0,29*     | 2,17±0,13*             |
| β-галактозидаза   | СА  | 0,38±0,05*     | 0,021±0,005    | 0,020±0,003            |
|   | НСА | 3,86±0,28*     | 0,59±0,04*     | 1,39±0,11*             |
| ДНКаза  | СА  | 0,55±0,05*     | 0,93±0,07*     | 0,44±0,04*             |
|   | НСА | 1,83±0,10*     | 2,56±0,10*     | 2,37±0,14*             |
| Применение ловастатина на фоне аллоксанового диабета (14 день)  |     |                |                |                        |
| Катепсин Д  | СА  | 0,84±0,07*     | 0,22±0,02 *    | 0,66±0,06 *            |
|   | НСА | 5,19±0,18 * ** | 2,98±0,23 * ** | 1,69±0,13 * **         |
| β-галактозидаза   | СА  | 0,32±0,03 *    | 0,027±0,005    | 0,014±0,002            |
|   | НСА | 2,31±0,11 * ** | 0,34±0,03 * ** | 0,96±0,05 * **         |
| ДНКаза  | СА  | 0,70±0,04 * ** | 1,24±0,06 * ** | 0,58±0,07 *            |
|   | НСА | 1,54±0,05 * ** | 2,12±0,12 * ** | 1,97±0,08 * **         |
| Применение симвастатина на фоне аллоксанового диабета (14 день) |     |                |                |                        |
| Катепсин Д  | СА  | 0,97±0,07 * ** | 0,21±0,03 *    | 0,72±0,06              |
|   | НСА | 4,95±0,09 * ** | 3,08±0,18 * ** | 1,71±0,13 * **         |
| β-галактозидаза   | СА  | 0,44±0,06 *    | 0,023±0,002    | 0,021±0,002            |
|   | НСА | 2,12±0,08 * ** | 0,43±0,04 * ** | 0,92±0,08 * **         |
| ДНКаза  | СА  | 0,73±0,05 * ** | 1,27±0,09 * ** | 0,66±0,08 * **         |
|   | НСА | 1,47±0,08 * ** | 2,02±0,12 * ** | 1,86±0,11 * **         |

Примечание: СА – седиментируемая активность, НСА – неседиментируемая активность.

\* - отмечена достоверность изменений по отношению к контролю (интактные животные),

\*\* - отмечена достоверность изменений по отношению к контролю диабета.

Таким образом, установлено, что при аллоксановом диабете в печени, миокарде и скелетной мышце происходит значительная лабилизация мембран лизосом, что доказывает резкое

повышение неседиментируемой активности лизосомальных катепсина Д, β-галактозидазы и ДНК-азы на фоне снижения седиментируемой активности.

Полученные изменения связаны с тем, что в патогенезе аллоксанового диабета большое значение имеет развитие окислительного стресса из-за генерации активных форм кислорода, что провоцирует повреждение биологических мембран [7]. Активация перекисного окисления липидов возникает также при инсулиновой недостаточности, что вызывает модификацию структуры липопротеиновых комплексов и приводит к нарушению проницаемости мембран [4].

Курсовое 14 дневное применение статинов на фоне аллоксанового диабета способствует стабилизации лизосомальных мембран, что сопровождается умеренным снижением неседиментируемой активности исследуемых лизосомальных гидролаз. Полученные данные позволяют считать, что статины оказывают мембранопротективный эффект при экспериментальном аллоксановом диабете. Мембраностабилизирующие свойства статинов могут быть связаны с рядом антиоксидантных эффектов, характерных для препаратов этой фармакологической группы. Под действием статинов угнетается экспрессия прооксидантных ферментативных систем и активируется синтез антиоксидантных ферментов [5]. Ингибируя синтез фарнезил пирофосфата и геранилгеранил пирофосфата, статины снижают оксидазную активность НАДН/НАД(Ф) Н-оксидаз в результате чего тормозится образование свободных радикалов и в первую очередь супероксид-анион радикала [15]. Проявлению антиоксидантного эффекта статинов способствует также стимуляция активности антиоксидантных ферментов - каталазы, параоксоназы [13], глутатионтрансферазы и глутатионпероксидазы [10]. Степень выраженности антиоксидантного действия статинов пропорциональна глубине перекисидации [14].

### **Выводы**

1. При аллоксановом диабете наблюдается значительное увеличение неседиментируемой активности и снижение седиментируемой активности катепсина Д, β-галактозидазы и ДНКазы в печени, миокарде и скелетной мышце крыс, что отражает значительную лабильность мембран лизосом.

2. При аллоксановом диабете курсовое назначение ловастатина (24 мг/кг) и симвастатина (20 мг/кг) в течение 14 дней приводит к умеренному снижению неседиментируемой активности и повышению седиментируемой активности лизосомальных катепсина Д, β-галактозидазы и ДНКазы в печени, миокарде и скелетной мышце крыс, что характеризует мембраностабилизирующее действие препаратов в условиях мембранной патологии.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Аметов А.С. Статины в управлении сахарного диабета 2 типа / А.С. Аметов, Е.В. Сокарева // Рус. мед. журн. – 2006. - № 26. – С. 1901-1904.
2. Аронов Д.М. Кардиостабилизация больных ишемической болезнью сердца: рецепт для России / Д.М. Аронов // Лечащий врач . – 2007. - № 3. – С. 22-26.
3. Аронов Д.М. Плеотропные эффекты статинов / Д.М. Аронов // Рус. мед. журн. – 2001. - №13-14. – С. 578-582.
4. Гурина А.Е. Состояние цитоплазматических мембран при экспериментальном сахарном диабете: [Электронный ресурс] / А.Е. Гурина, С.Г. Дзугкаев – Электрон. дан. - Режим доступа: [www.diabet.ru/Sdiabet/1999-03/12.htm](http://www.diabet.ru/Sdiabet/1999-03/12.htm)
5. Дриницина С.В. Антиоксидантные свойства статинов / С.В. Дриницина, Д.А. Затейщиков // Кардиология. – 2005. - №4. - С. 65-72.
6. Красницкий В.Б. Вторичная профилактика ишемической болезни сердца: сочетание медикаментозной терапии и физических тренировок / В.Б. Красницкий // Лечащий врач . – 2007. - № 3. – С. 32-36.
7. Ланкин В.З. Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях / В.З. Ланкин, А.К. Тизазе, Ю. Н. Беленков. – М., 2001. – 78 с.
8. Метелица В.И. Справочник по клинической фармакологии сердечно-сосудистых лекарственных средств / В.И. Метелица. – М.: Медпрактика, 1996. – 784с.
9. Покровский А.А. Методы разделения и ферментной идентификации субклеточных фракций / А.А. Покровский, А.И. Арчаков, О.Н. Любимова // Современные методы в биохимии. - М., 1968. - С.5-59.
10. Родненкова О.С. Плейотропные биохимические эффекты статинов и возможности их коррекции: автореф. дис. ... канд. мед. наук / О.С. Родненкова. – Рязань, 2006. - 23 с.

11. Сорокин Е.В. Современные подходы к лечению артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца / Е.В. Сорокин // Кардиология . – 2006. - № 4. – С. 81-84.
12. Anson M.L. // J. Gen. Physiol. -1939. - Vol.22. - P. 79.
13. Effect of Simvastatin Therapy on Paraoxonase Activity and Related Lipoproteins in Familial Hypercholesterolemic Patients / M. Tomas [et al.] // Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. -2000. – Vol. 20. – P. 2113-2118.
14. MacNee W. Treatment of stable COPD: antyoxoydant / W. MacNee // Eur. Respir. Rev. – 2005. – Vol.14,№94. – P. 12-22.
15. Wolin M.S. Interactions of Oxidants With Vascular Signaling Systems / M.S. Wolin // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2000. – Vol. 20. – P. 1430.

#### EFFECTS OF STATINES ON ACTIVITY OF LYSOSOMAL HYDROLASES IN ALLOXAN DIABETES

A.S.Polupanov

**Paper shows that alloxan diabetes in rats increases nonsedimenteted activity of lysosomal hydrolases in liver, myocardium and skeletal muscle, but decreases nonsedimenteted activity of them. Lovastatin and simvastatin cause decreases of expressiveness of these processes in rats with alloxan diabetes.**

**Key words:** alloxan diabetes, experiment, lysosomal hydrolase

Полупанов А.С. – ассистент кафедры фармакологии с курсом фармакотерапии ФПЛО, ГОУ ВПО Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Росздрава; [root@ryazgmu.ryazan.ru](mailto:root@ryazgmu.ryazan.ru)