

УДК 612.015.39

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АДАПТАЦИИ КРЫС К УСЛОВИЯМ АЛЛОКСАНОВОГО ДИАБЕТА

Гати Моханнад Абдулраззак Гати, Федорин Д.Н., Полякова-Семенова Н.Д.,
Вашанов Г.А., Епринцев А.Т.

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

С помощью экзогенного аллоксана была создана модель экспериментального диабета у крыс. Для экспериментальных животных выявлено изменение концентрации глюкозы и гликогена в крови, массы тела и внутренних органов. Показаны выраженные признаки токсического гепатита в паренхиме печени животных в виде нарушения балочной структуры долек, некроза гепатоцитов, наличия инфильтратов из скоплений гематогенных клеток. Кроме того, выявлены патоморфологические изменения в островковой части поджелудочной железы, носящие выраженный деструктивный характер. Установлено, что аллоксановый диабет индуцирует активность ферментов, осуществляющих функционирование цикла трикарбоновых кислот в печени, почках и поджелудочной железе. Увеличение активности маркерного фермента ЦТК и митохондриальных форм МДГ и АГ убедительно свидетельствует об интенсификации катаболизма, обуславливающего повышение энергетического потенциала, необходимого для осуществления адаптивной реакции. Показано, что индукция активности СДГ, АГ и МДГ осуществляется по механизму синтеза *de novo*, о чем свидетельствуют полученные данные об уровнях экспрессии генов *sdha*, *mdh_mtx* и *aco*.

Ключевые слова: диабет, гистология, регуляция, изофермент, сукцинатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, аконитатгидратаза, экспрессия генов

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS OF ADAPTATION RATS TO CONDITIONS ALLOXAN DIABETES

Gati Mohammad Abdulrazzak Gati, Fedorin D.N., Polyakova-Semenova N.D.,
Vashanov G.A., Eprintsev A.T.

Voronezh State University, Voronezh, e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Using exogenous alloxan was established experimental model of diabetes in rats. For experimental animals showed changes in the concentration of glucose and glycogen levels, body weight and visceral. Showing pronounced signs of toxic hepatitis in the liver parenchyma of animals in the form of disruption beam structure cloves, necrosis of hepatocytes, the presence of clusters of infiltrates hematogenous cells. In addition, the pathological changes found in the pancreatic islet of wearing expressed destructive character. Found that the activity of alloxan induced diabetes enzymes performing the operation cycle of tricarboxylic acids in the liver, kidney and pancreas. The increased activity of a marker enzyme of TCA cycle and mitochondrial forms of MDH and AH and convincing evidence of the intensification of catabolism, causing increased energy capacity for the implementation of an adaptive response. It is shown that the induction of activity SDH, MDH and AH is mechanism by synthesis *de novo* as evidenced by the data obtained about the levels of gene expression *sdha*, *mdh_mtx* and *aco*.

Keywords: diabetes, histology, regulation, isozyme, succinate dehydrogenase (SDH), malate dehydrogenase (MDH), aconitate hydratase (AH), gene expression

Адаптация животного организма к аллоксановому экспериментальному диабету представляет сложный многоэтапный процесс, главным звеном которого является трансформация клеточного метаболизма. Индукция ферментов глиоксилатного цикла и цикла трикарбоновых кислот в тканях животных обеспечивает изменение основных путей метаболизма, обусловленных ресинтезом гликогена в печени крыс при патологиях, связанных с условиями пищевой депривации и экспериментального диабета [2, 10]. Кроме того, что глюконеогенез выступает как важнейший процесс при адаптивной реакции организма к экстремальным условиям, важную роль играет энергетический обмен, связанный, главным образом с функционированием цикла Кребса. Следовательно, адаптация клеточного метаболизма обеспечивается соотношением интенсивности катаболизма и анабо-

лизма глюкозы в клетках печени и других органов животного организма. Несмотря на значительное количество исследований об интенсивности ферментативной активности, обуславливающей скорость энергетического и синтетического процессов, остаются невыясненными многие факторы регуляции, такие как концентрация метаболитов, воздействие гормонов и другие [4].

В литературе широко представлены работы об особенностях клинико-биохимических показателей при сахарном диабете. Данные морфологических исследований немногочисленны и зачастую разноплановы. В последнее время большое внимание исследователей направлено на изучение состояния нейроэндокринных центров и выяснение их участия в регуляции функций панкреатических островков [5].

Особый интерес вызывает молекулярный уровень регуляции ферментов ЦТК

и гликозилатного цикла, связанный с экспрессионной регуляцией ферментов. Ранее было показано наличие двух изоформ аконитатгидратазы, малатдегидрогеназы. Однако исследований по генетической детерминации изоферментного полиморфизма этих и других ферментных систем в животных организмах в условиях экспериментального диабета нами не обнаружено. В связи с этим **целью данной работы** являлось комплексное исследование физиолого-биохимических механизмов адаптации крыс при аллоксановом диабете.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования служили самцы лабораторных крыс (*Rattus rattus* L.) массой 200–250 гр., выращенные в виварии при стандартном рационе. Индукцию диабета у исследуемых животных вызывали введением внутривенно 5% раствора аллоксана из расчета 100 мг на кг веса животного в 0,9% растворе NaCl. Контрольные животные выращивались при обычном пищевом режиме, без введения аллоксана.

Для получения ткани печени, почек и поджелудочной железы опытных животных подвергали краниоцервикальной дислокации под эфирным наркозом.

Определение глюкозы производили стандартным глюкозооксидазным методом с помощью глюкометра «Сателлит плюс» (Россия).

Определение активности ферментов проводили при 25°C с помощью спектрофотометрических методов [4].

Для выделения суммарной клеточной РНК использовался метод фенол-хлороформной экстракции с использованием в качестве осадителя LiCl [9].

Полимеразную цепную реакцию генспецифичными праймерами проводили с помощью набора реактивов AmpliSence (Хеликон, Россия) на приборе Bio-Rad DNA Engine Thermal Cycler Chromo 4 (Bio-Rad, США), используя в качестве красителя SYBR Green. Параметры амплификации: предварительная денатурация 95°C – 5 мин, затем цикл: 95°C – 20 с, 58°C – 30 с, 72°C – 40 с (детекция), финальная элонгация – 72°C – 10 мин.

Фиксацию материала осуществляли по методике, предложенной Волковой [1]. Образцы уплотняли для последующей работы на микротоме. Предварительные образцы обезжировали путем погружения на 24 часа в растворы спиртов разных концентраций. Заливку проводили инкубацией образцов в смесь ксилол-парафин и затем в жидкий парафин на 1–2 ч при 52–56°C. Срезы приготавливали при помощи микротомы 4/MedGV (Micos, Германия) [6]. Окраску препарата проводили с применением гематоксилин-эозина по ранее разработанной методике [8].

Опыты проводили в 3–4-кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в трех повторностях [7].

Результаты исследования и их обсуждение

Введение аллоксана подопытным животным способствовало увеличению концентрации глюкозы в крови до 15,8 ммоль/л через 10 дней после инъекции. Проведение данных анализов в динамике в течение 21 дня

позволило выявить определенные закономерности. Максимальное значение этого показателя в крови опытных крыс достигало 17,31 ммоль/л. Следовательно, при экспериментальном сахарном диабете происходила мобилизация эндогенных сахаров, которые в печени крысы представлял гликоген.

Анализ полученных данных позволяет выявить определенные тенденции в изменении исследуемых показателей. Так, масса тела контрольных животных увеличивалась в течение всего эксперимента. Ее колебания составляли от 197 г в первый день до 217 г на 21 день. Следовательно, крысы контрольной группы увеличивали свою массу в течение всего опыта на 11,3%. Противоположная картина обнаружена для данного показателя в экспериментальной группе животных. Динамика изменения массы печени и почек не являлась одинаковой для этих органов. Масса печени, составлявшая 6,49 г в начале опыта у контрольных животных, достигала величины 6,7 г. У экспериментальных животных после введения экзогенного аллоксана масса этого органа уменьшилась с 6,35 до 4,83 г через 21 день экспозиции, что означало 24%-е снижение массы печени.

Анализ полученных результатов по изменению массы тела и внутренних органов крыс позволяет предположить, что выявленные эффекты связаны с действием экспериментального диабета.

Анализ данных гистологических исследований образцов печени крыс экспериментальной группы свидетельствовал о том, что применение аллоксана вызывало индукцию сахарного диабета, проявляющегося в изменении морфологических особенностей тканей исследуемого органа. В целом при экспериментальном аллоксановом диабете в паренхиме печени исследуемых животных прослеживались выраженные признаки токсического гепатита в виде нарушения балочной структуры долек, некроза гепатоцитов, жировой и белковой дистрофии, наличия инфильтратов из скоплений гематогенных клеток.

Морфологические изменения в ткани поджелудочной железы крыс после введения аллоксана характеризовались наиболее выраженными дегенеративными изменениями в центральных отделах островков Лангерганса (рис. 1). Количество β -клеток в островках резко снижено, в большинстве из них отмечалась вакуолизация цитоплазмы, уменьшение размеров ядер, конденсация хроматина, в некоторых клетках – кариопикноз. Выявлено наличие лимфоцитарного инфильтрата по периферии части островков, отека междольковой соединительной ткани, полнокровие капилляров; в сосудах прослеживались стазы.

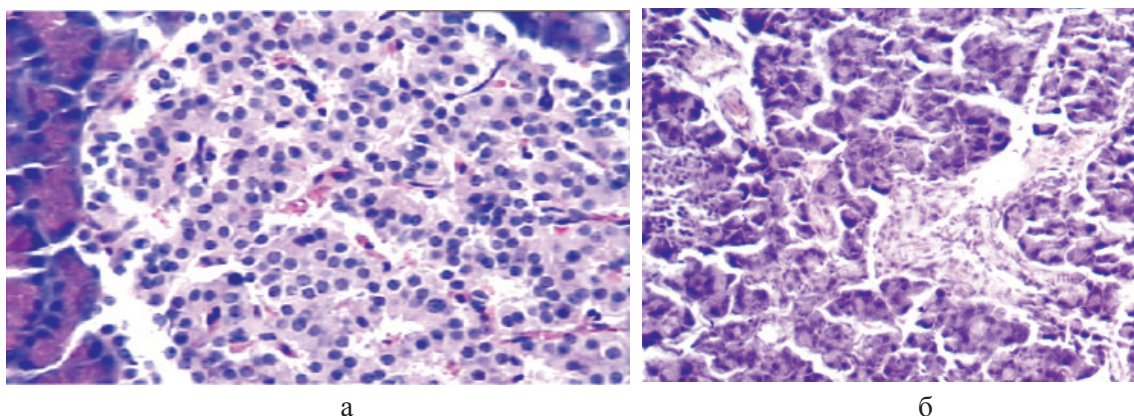


Рис. 1. Островковый аппарат поджелудочной железы крысы интактной группы (А) и после введения аллоксана (Б). Окраска гематоксилином-эозином; об. $\times 20$

Таким образом, цитотоксическое воздействие аллоксана и инсулиновая недостаточность вызывали патоморфологические изменения в островковой части поджелудочной железы, носящие выраженный деструктивный характер, причем токсическому воздействию в наибольшей степени подвергались β -клетки и компоненты микроциркуляторного русла.

Результаты исследования показали, что в печени крыс с аллоксановым диабетом наблюдается активация маркерного фермента ЦТК – сукцинатдегидрогеназы (СДГ), активность которого увеличилась у опытных животных в 1,77 раза. Увеличение активности сукцинатдегидрогеназы в печени крыс свидетельствует об интенсификации функционирования цикла Кребса в условиях аллоксанового диабета, что, по-видимому, необходимо для энергизации клеточного дыхания и усиления поставок энергетических эквивалентов АТФ, НАДН для адаптации клеточного метаболизма в гепатоцитах.

Активность цитоплазматической формы малатдегидрогеназы (МДГ) в образцах опытных животных составляет 9,38 Е/мг белка, а в контрольных – 4,36 Е/мг белка. Однако иная картина наблюдалась при анализе изменения активности митохондриальной формы малатдегидрогеназы. У крыс в условиях аллоксанового диабета обнаружено резкое увеличение скорости функционирования МДГ в 3,96 раза относительно контрольного варианта.

В наших исследованиях было показано, что активность цитоплазматической аконитатгидратазы (АГ) в опытных образцах по сравнению с контролем уменьшилась в 3,8 раза. Что касается митохондриальной формы, то здесь наблюдается увеличение активности в 3 раза относительно контрольного варианта. В гепатоцитах доминируют реакции синтетического или конструктивного характера, в частности, глюконеогенез, одним из этапов которого является ГЦ.

Именно в протекании данного пути принимает участие аконитатгидратаза.

Уровень активности сукцинатдегидрогеназы в исследуемом органе нормальных крыс составлял 0,4 Е/мг белка. У экспериментальных животных поджелудочная железа имела невысокий уровень активности СДГ равный 0,14 Е/мг белка, то есть экспериментальный диабет подавлял функционирование маркерного фермента.

Изменение активности малатдегидрогеназы в разных фракциях клеток поджелудочной железы в контроле и опыте имело определенные тенденции. Уровень активности изучаемого фермента в клетках поджелудочной железы крыс, подвергшихся воздействию аллоксанового диабета, был выше по сравнению с опытными животными.

Уровень активности аконитатгидратазной ферментной системы определяет направление реакций так называемого аконитазного равновесия. Величина аконитазной активности в поджелудочной железе в опытных вариантах возрастала в 2–2,5 раза и составляла значение 0,25 Е/мг белка для цитоплазматической формы и 2,5 Е/мг белка для митохондриальной формы фермента. Следовательно, повышение интенсивности функционирования аконитатгидратазного ферментного комплекса наблюдается как в цитоплазматической фракции, так и в митохондриальной.

Результаты исследования ПЦР-РВ приведены на рис. 2, из которого видно, что в печени крыс при пищевой депривации концентрация транскрипта исследуемого генов МДГ выше такового показателя у контрольных в более чем в 2 раза, что свидетельствует об интенсификации их экспрессии.

Расчетные значения относительной концентрации кДНК гена митохондриальной аконитатгидратазы и сукцинатдегидроге-

назы в разных образцах отличаются между собой. Из полученных данных видно, что в печени крыс с аллоксановым диабетом

концентрация их транскриптов выше такового показателя у контрольных почти в 3 раза.

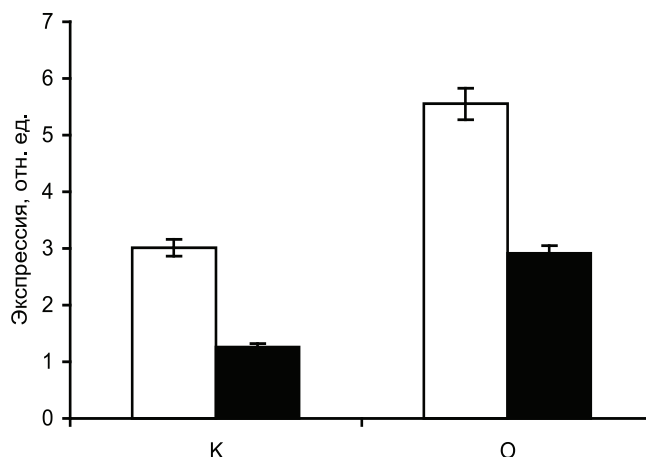


Рис. 2. Экспрессия генов малатдегидрогеназы в печени крыс в норме и при аллоксановом диабете. К – контрольные животные, О – животные с аллоксановым диабетом

Данные по экспрессии генов СДГ, МДГ, АГ свидетельствуют, что при диабете активация ферментов происходит на уровне транскрипции соответствующих генов. В условиях аллоксанового диабета наблюдается изменение транскрипционной активности ДНК клеток печени, следовательно, увеличивается скорость экспрессия исследуемых генов.

Заключение

Использование в нашем исследовании экзогенного аллоксана, вводимого подкожно крысам, позволило создать модель экспериментального диабета у животных. Индукция диабета наблюдалась в течение трехнедельного эксперимента. У опытных животных было выявлено изменение массы тела и внутренних органов, характерное для данного заболевания. Проведенные гистологические исследования тканей печени и поджелудочной железы также свидетельствуют о патологических изменениях у экспериментальных крыс, при этом наибольшее токсическое действие наблюдалось в печени исследуемых животных.

Использование методов молекулярной биологии позволило установить, что индукция активности СДГ, АГ и МДГ осуществляется благодаря синтезу *de novo*. Это вытекает из полученных данных, свидетельствующих о резком повышении уровня экспрессии генов *sdha*, *mdh_mtx* и *aco*, кодирующих эти ферменты.

Таким образом, показано, что адаптация крыс к условиям аллоксанового диабета осуществляется на нескольких

уровнях. Патоморфологические изменения в островковой части поджелудочной железы и нарушение балочной структуры долек гепатоцитов сопряжены с трансформацией основных путей клеточного метаболизма, обеспечиваемой изменением функционирования ключевых ферментов цикла Кребса и глиоксилатного пути (СДГ, МДГ и АГ).

Список литературы

1. Волкова О.В. Основы гистологии с гистологической техникой / О.В. Волкова, Ю.К. Елецкий. – М.: Медицина, 1971. – С. 272.
2. Епринцев А.Т. Глиоксилатный цикл: универсальный механизм адаптации? / А.Т. Епринцев, В.Н. Попов, М.Ю. Шевченко. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2007. – 228 с.
3. Епринцев А.Т. Полимеразная цепная реакция как универсальный метод диагностики и идентификации генов / А.Т. Епринцев, Е.А. Москалёв, В.Н. Попов // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. – 2001. – № 1. – С. 9–14.
4. Епринцев А.Т. Экспрессия и регуляция ферментов глиоксилатного цикла / А.Т. Епринцев, В.Н. Попов, М.Ю. Шевченко. – Воронеж: Центрально-Черноземное книжное изд-во, 2005. – 224 с.
5. Жураковская О.Я. Изменение структуры вентромедиального ядра гипоталамуса крыс разного возраста при экспериментальном сахарном диабете // Морфология. – 2013. – Т. 143, № 1. – С. 16–22.
6. Лавдовский М.Д. Основания к изучению микроскопической анатомии человека и животных. – СПб., 1887. – 1105 с.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
8. Лили Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. – М.: Мир, 1969. – С. 102–108, 157–167.
9. Chomczynski P. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // Anal. Biochem. – 1987. – Vol. 162. – P. 156–159.

10. Popov V.N. Glioxilate cycle enzymes are present in liver peroxisomes of alloxan-treated rats // *FEBS Lett.* 1998. – Vol. 440. – P. 55–58.

References

1. Volkova O. Fundamentals of histology with histological techniques / O.V. Volkov, J.K. Eletsii. Moscow: Medicine, 1971. pp. 272.

2. Eprintsev A.T. Glyoxylate cycle: a universal mechanism for adaptation? / A.T. Eprintsev, V.N. Popov, M.Yu. Shevchenko. Moscow: «Akademkniga», 2007. pp. 228.

3. Eprintsev A.T. Polymerase chain reaction as a universal method of diagnosis and identification of genes / A.T. Eprintsev, E.A. Moskalev, V.N. Popov // *System analysis and control in biomedical systems.* 2001. no. 1. pp. 9–14.

4. Eprintsev A.T. Expression and regulation of enzymes of the glyoxylate cycle / A.T. Eprintsev, V.N. Popov, M.Yu. Shevchenko. Voronezh, Central Black Earth book publishing house, 2005. pp. 224.

5. Zhurakovskaya O.J. Changing the structure of the ventromedial nucleus of the hypothalamus of rats of different ages in an experimental diabetes / O.J. Zhurakovskaya // *Morphology.* 2013. Vol. 143, no. 1. pp. 16–22.

6. Lavdovsky M.D. Reasons to study the microscopic anatomy of humans and animals. St. Petersburg, 1887. pp. 1105.

7. Lakin G.F. Biometrics. M.: Higher School, 1990. pp. 352.

8. Lily R. histopathological technique and practical histochemistry. Academic Press, 1969. pp. 102–108, 157–167.

9. Chomczynski P. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // *Anal. Biochem.* 1987. Vol. 162. pp. 156–159.

10. Popov V.N. Glioxilate cycle enzymes are present in liver peroxisomes of alloxan-treated rats // *FEBS Lett.* 1998. Vol. 440. pp. 55–58.

Рецензенты:

Свистова И.Д., д.б.н., профессор кафедры биологии растений и животных, ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный педагогический университет», г. Воронеж;

Алабовский В.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой биохимии, ФГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия имени Н.Н. Бурденко», г. Воронеж;

Хисматуллина З.Р., д.б.н., профессор, доцент, заведующая кафедрой морфологии и физиологии человека и животных биологического факультета, ГОУ ВПО «Башкирский государственный университет», г. Уфа.

Работа поступила в редакцию 16.12.2013.