

## ВЛИЯНИЕ ЦИТАФАТА НА СОСТОЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА У КРЫС С ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИЕЙ

В. Б. Молотов-Лучанский, С. С. Кудрявцев, Л. Е. Муравлева, А. М. Газалиев<sup>1</sup>

Цель работы — изучение антиоксидантной эффективности цитафата (0,0,-диметил-N-цитизинилфосфата) при лечении крыс с аллоксановым диабетом. Исследования проводили на беспородных белых крысах, у которых моделировали инсулинзависимый сахарный диабет. В эритроцитах исследовали концентрацию малонового диальдегида, диеновых конъюгатов, кетодиенов, средних молекул, суммарных первичных и суммарных вторичных продуктов, Шиффовых оснований, активность ферментов каталазы, глутатионпероксидазы и аденозиндезаминазы. В плазме крови изучали состояние окислительной модификации белка, содержание малонового диальдегида и диеновых конъюгатов, генерацию супероксид-аниона. Установлено, что в крови крыс, страдающих диабетом, имеет место интенсификация процессов липопероксидации и окислительной модификации белка при практически постоянно повышенном уровне генерации супероксид-анионов. Цитафат способствовал снижению интенсивности липопероксидации и окислительной модификации белка, нормализации уровня генерации супероксид-анионов и активности ферментов антиоксидантной защиты.

**Ключевые слова:** аллоксановый диабет, цитафат, перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита, окислительная модификация белка

### ВВЕДЕНИЕ

Усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ) является неспецифическим процессом и имеет место при различных патологических состояниях, в том числе и при сахарном диабете [9, 13]. В  $\lambda$ -клетках поджелудочной железы происходит восстановление аллоксана в диалуровую кислоту с последующим аутоокислением в аллоксан, сопровождающееся генерацией супероксид-аниона [20]. Ряд исследователей изучал роль супероксиддисмутазы в реакции дисмутации супероксид-анион-радикала [15, 21], однако, в литературе не встречались количественные параметры выхода этого продукта окислительного метаболизма (ОМ) при данной патологии. Активные формы кислорода индуцируют также окислительную модификацию белка (ОМБ) — систему, которая подвергается их действию наряду с системой “перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита” (ПОЛ – АОЗ). Несмотря на то что механизмы ОМБ весьма разнообразны — они связаны с влиянием на структуру белковой молекулы, структурный центр ферментов [7, 8], данные об этом аспекте ОМ при изучаемой нами патологии практически не встречаются. В этой связи представляется актуальным поиск путей воздействия на ОМ, в частности, коррекции антиоксидантного статуса. Одним из таких путей является применение препаратов с антиоксидантными свойствами. К последним относится цитафат — 0,0,-диметил-N-цитизинилфосфат, синтезированный в Институте органического синтеза и уг-

лехимии НАН РК. Для этого препарата характерны низкая молекулярная масса, гидрофильность, а также способность не связываться с белками плазмы и обратимо связываться с форменными элементами, что облегчает его выведение почками [2, 18]. В настоящее время подтверждены его антигепатотоксические свойства (госрегистрация РК № 9718990). Установлено, что цитафат усиливает не только белковую, но и гликогенсинтезирующую функцию гепатоцитов. Антиоксидантный эффект цитафата подтвержден в экспериментальных моделях ряда патологических процессов [6, 17]. При аллоксановой модели диабета данный препарат не испытывался.

Целью данной работы явилось экспериментальное исследование эффективности антиоксидантной терапии цитафата на разных стадиях формирования диабетической нефропатии.

Наличие у крыс с аллоксановым диабетом нефропатии верифицировали морфологически по характерным изменениям в сосудистой архитектуре и интерстициальной ткани почек. Степень выраженности этих изменений оценивалась как соответствующая I и II стадии диабетической нефропатии по С. Mogensen.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на 32 беспородных половозрелых крысах-самцах массой тела  $210 \pm 20$  г. После предварительного содержания крыс в условиях голода (при сохраненном доступе к воде) у 26 из них под эфирным наркозом моделировали инсулинзависимый сахарный диабет путем введения в бедренную вену растворенного в 1 мл воды аллоксана (40 мг/кг). Было сформировано 6 групп. В 1-й группе ( $n = 3$ ) находились крысы со стойкой гипергликемией (ГГ), которым 7 сут ежедневно проводили антиоксидантную коррекцию цитафатом на 14-е сутки от появления ГГ. Во 2-й группе ( $n = 4$ ) находились крысы со стойкой ГГ, получавшие аналогичное лечение на 30-е сутки от появления ГГ. В 3-й группе ( $n = 4$ ) находились крысы со стойкой ГГ, получавшие цитафат в течение 21 сут по интермиттиру-

<sup>1</sup> Кафедра медицинской биологии с курсом микробиологии (зав. — проф. Л. Е. Муравлева) и кафедра пропедевтики внутренних болезней (зав. — доц. С. К. Туганбекова) Карагандинской государственной медицинской академии, Караганда, 470061, ул. Гоголя, 40. НИИ органического синтеза и углехимии АН РК, Караганда, 470061, ул. 40 лет Казахстана, 4.

## Показатели углеводного обмена и окислительного метаболизма в исследуемых группах

Показатель	Здоровые (n = 6)	Аллоксановый диабет 14 сут (n = 6)	Аллоксановый диа- бет 14 сут + 7 сут лечение цитафатом (n = 3)	Аллоксановый диабет 30 сут (n = 4)	Аллоксановый диа- бет 30 сут + 7 сут лечение цитафатом (n = 4)	Аллоксановый диа- бет 30 сут + 21 сут лечение цитафатом (n = 4)
Уровень глике- мии, ммоль/л, (до и после кор- рекции АФЦ)	3,75 ± 0,112	10,25 ± 0,544*	9,333 ± 0,888* 8 ± 1,0*	9,25 ± 0,629*	10,5 ± 3,75 * 7,625 ± 2,788*^	11,75 ± 3,75 6,125 ± 2,815
Эритроциты						
МДА, мкмоль/мл эр.	6,96 ± 0,297	12,585 ± 1,253*	11,325 ± 0,365*	10,289 ± 0,622*	7,564 ± 0,59*^	9,712 ± 0,64
ДК, усл. ед./мл эр.	20,04 ± 1,372	107,17 ± 5,746*	58,164 ± 3,052*	95,738 ± 9,926*	60,008 ± 9,37*^	52,354 ± 4,24
КД, усл. ед.	7,73 ± 0,803	84,91 ± 3,913*	52,614 ± 3,052*^	80,586 ± 7,569*^	49,784 ± 6,044*^	48,202 ± 1,55
СПП, усл. ед.	0,47 ± 0,013	0,685 ± 0,028*	0,592 ± 0,011*	0,794 ± 0,023*	0,563 ± 0,035*^	0,637 ± 0,045
СВП, усл. ед.	0,123 ± 0,012	0,544 ± 0,023*	0,536 ± 0,003*	0,673 ± 0,036*	0,477 ± 0,035*^	0,597 ± 0,06
ШО, усл. ед.	0,03 ± 0,012	0,044 ± 0,002*	0,038 ± 0,014*^	0,06 ± 0,003*	0,019 ± 0,003*^	0,067 ± 0,01
СМ, усл. ед.	0,07 ± 0,0022	0,165 ± 0,006*	0,106 ± 0,018*^	0,147 ± 0,013*	0,125 ± 0,005*^	0,141 ± 0,02
КАТ, нмоль/Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> / мл эр./мин	0,34 ± 0,003	0,288 ± 0,007*	0,324 ± 0,016	0,287 ± 0,046*	0,37 ± 0,018*^	0,33 ± 0,045^
АДА, нмоль/АД/мл эр./мин	8,8 ± 0,216	6,502 ± 0,168*	5,741 ± 0,344*^	6,451 ± 1,542*	6,945 ± 0,631*	8,488 ± 1,29
ГПО, нмоль/Gs?H/мл эр./мин	82,81 ± 3,695	89,688 ± 0,907	78,925 ± 1,025	93,455 ± 6,213*	80,181 ± 4,417^	76,157 ± 6,91
Плазма						
МДА, нмоль/мл плазмы	3,22 ± 0,313	4,282 ± 0,09*	4,282 ± 0,038*	5,88 ± 0,185*	4,795 ± 0,076*^	6,53 ± 1,002
ДК, усл. ед./мл плазмы	0,4 ± 0,17	1,659 ± 0,06*	1,991 ± 0,205*	1,921 ± 0,212*	1,977 ± 0,297*	1,773 ± 0,41
ОМБ, усл. ед.	4,77 ± 0,533	4,118 ± 0,077*	3,317 ± 0,585*^			
λ = 356 нм	5,54 ± 0,638	F 4,57 ± 0,134*	3,753 ± 0,727*^	5,19 ± 1,158	5,675 ± 1,344*	4,335 ± 0,94
	3,596 ± 0,25	3,215 ± 0,061*	2,73 ± 0,526*^	5,793 ± 1,281	6,288 ± 1,52*	4,898 ± 1,133
λ = 370 нм	0,53 ± 0,0066	0,773 ± 0,019*	0,673 ± 0,098*^	3,55 ± 0,471	3,89 ± 0,861	3,058 ± 0,65
λ = 430 нм				0,727 ± 0,049*	0,828 ± 0,143*^	0,38 ± 0,035
λ = 530 нм						
Генерация СОА, %	62,97 ± 3,267	83,62 ± 3,2*	65,08 ± 3,573	83,555 ± 1,299*	50,0 ± 4,122*^	65,478 ± 6,6

**Примечание.** Различия достоверны по сравнению: \* — с нормой ( $p < 0,05$ ), ^ — с контрольными группами ( $p < 0,05$ ).

ющей схеме, также на 30-е сутки от момента регистрации ГГ. Препарат вводили в желудок в дозе 100 мг/кг в 1 мл физиологического раствора. В группы сравнения вошли крысы со стойкой ГГ, выведенные из эксперимента через 14 сут — 1-я ( $n = 6$ ), 30 сут — 2-я ( $n = 4$ ) и 90 сут — 3-я группа сравнения ( $n = 5$ ) после отмеченной ГГ, которым не проводилась коррекция цитафатом.

Показатели гликемии регистрировали при помощи стандартных наборов реактивов фирмы “Boehringer-Manheim”.

Определение параметров ПОЛ производили по стандартным методикам. В эритроцитах исследовали концентрацию малонового диальдегида (МДА) [5], диеновых конъюгатов (ДК) и кетодиенов (КД) [19], суммарных первичных продуктов (СПП), суммарных вторичных продуктов (СВП) и шиффовых оснований (ШО) [14], средних молекул (СМ) [10], а также активность ферментов — каталазы (КАТ) [12], глутатионпероксидазы (ГПО) [3] и аденозиндезаминазы (АДА) [16]. В плазме крови изучали состояние окислительной модификации белка (ОМБ) [8] и генерацию супероксид-аниона [1], определяли содержание МДА [11] и ДК [4].

Результаты исследования обработаны методом вариационной статистики с использованием  $t$ -критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У крыс с аллоксановым диабетом, не получавших препарат, в плазме происходило достоверное повышение образования супероксид-аниона, что согласуется с данными других исследователей [22]. Этот факт обусловлен не только ГГ, но и цитотоксическим действием аллоксана. У крыс 3-й группы сравнения отмечается тенденция к снижению генерации супероксид-аниона по сравнению с 1-й и 2-й группами (таблица). У крыс, получавших лечение цитафатом, произошла нормализация образования супероксид-аниона, а у крыс 2-й группы образование супероксид-аниона снизилось на 20 % относительно нормы, что наряду со

снижением содержания ряда метаболитов ПОЛ подтверждает антиоксидантный эффект препарата.

Образовавшиеся в 1-й стадии ОМ супероксид-анионы индуцировали развитие 2-й стадии ОМ. На это указывает значительное изменение состояния ОМБ (таблица). У крыс 1-й группы сравнения изменения состояния ОМБ имеют разнонаправленный характер: незначительно понизилось содержание алифатических альдегид-динитрофенилгидразонов нейтрального характера ( $\lambda = 356$  нм), фенилгидразонов и карбонильных групп ( $\lambda = 370$  нм), динитрофенилгидразонов (ДФГ) основного характера ( $\lambda = 430$  нм), тогда как уровень кетонпроизводных ДФГ ( $\lambda = 530$  нм) повысился в 1,5 раза. Применение цитафата в 1-й группе позволило достоверно снизить (в сравнении с нормой контролем) уровень трех первых показателей ОМБ. Содержание кетонпроизводных ДФГ по сравнению с контролем также достоверно снизилось, но продолжает превышать норму. Несколько иначе выглядит состояние ОМБ у крыс с продолжительностью диабета до 30 сут: наблюдается тенденция к накоплению алифатических альдегид-ДФГ нейтрального характера, фенилгидразонов и карбонильных групп, уровень кетонпроизводных значительно превышает норму. Содержание ДФГ основного характера практически не изменилось. Данный показатель изменяется при применении цитафата: у крыс 2-й группы наблюдалась тенденция к его увеличению. В 3-й группе — тенденция к уменьшению. Вместе с тем у крыс 2-й группы наблюдалось достоверное увеличение остальных продуктов ОМБ. Наиболее весомым оно было у кетонпроизводных ДФГ (прирост составил около 60 %). На состояние ОМБ в 3-й группе применение препарата повлияло более позитивно: произошло достоверное снижение всех компонентов ОМБ, особенно кетонпроизводных ДФГ (на 30 %). Наибольшие нарушения в ОМБ заметны у крыс 3-й группы контроля. Там произошло почти двукратное увеличение всех показателей ОМБ, что позволяет предположить влияние более длительной экспозиции ГГ.

У крыс 1-й группы сравнения резко возросла скорость передислокации двойных связей в ненасыщенных жирных кислотах мембран, что видно по многократному увеличению содержания ДК и СПП. Токсические продукты ПОЛ накапливаются так же интенсивно. Отстает от этого процесса скорость накопления конечных продуктов — ШО в эритроцитах.

Применение цитафата позволило существенно снизить концентрацию первичных продуктов перекисидации, однако уровень вторичных продуктов ПОЛ, несмотря на достоверное снижение, продолжал значительно превышать значения нормы. Вместе с этим произошло приближение значений ШО к норме и достоверное снижение концентрации СМ, что говорит о снижении препаратом токсического действия метаболитов ПОЛ. Поскольку препарат имеет внутриклеточную локализацию, он не мог так же активно, как и в эритроцитах оказывать антиоксидантное действие — в

результате уровень ДК 5-кратно превысил норму, а уровень МДА не имеет достоверного отличия от контроля.

В эритроцитах у крыс 1-й группы сравнения наблюдается слабовыраженная тенденция к снижению активности КАТ и аналогичная тенденция к повышению активности ГПО. Активность АДА достоверно снижена, что говорит о существенных нарушениях в энергетике клетки. Применение АФЦ привело к нормализации активности КАТ и СОД у крыс 1-й группы. Вместе с тем отмечено отсутствие эффекта в отношении АДА.

Во 2-й группе сравнения интенсивность липопероксидации сохраняется на высоком уровне. При этом процессы ПОЛ активизируются преимущественно на стадии пропагации. Это вытекает из значительного прироста вторичных продуктов ПОЛ по сравнению с первичными как в плазме, так и в эритроцитах.

При более длительном течении диабета дисбаланс в системе АОЗ становится более очевидным: активность КАТ у крыс 2-й группы сравнения имеет тенденцию к снижению, тогда как активность ГПО повышается, что может объясняться некоторым снижением генерации супероксид-аниона, при котором ГПО действует более эффективно, чем КАТ. Стабилизация на низком уровне активности АДА свидетельствует о нарушениях в метаболизме азотистых оснований, что оказывает существенное влияние на антиоксидантную активность плазмы через регуляцию синтеза мочевой кислоты.

Применение цитафата позволило добиться достоверного снижения уровня практически всех продуктов липоперекисного каскада в эритроцитах у крыс 2-й и 3-й групп. Коррекция, проведенная во 2-й группе, оказала воздействие на наиболее уязвимое звено липопероксидной цепи. В результате этого стадия пропагации ПОЛ, которая в контроле преобладала по своей интенсивности у крыс данной группы, испытала блокирующее влияние цитафата. Содержание СВП, МДА и КД достоверно уменьшилось. В 3-й группе отмечено резкое снижение образования ДК и СПП, что свидетельствует о блокировании стадии инициации ПОЛ на фоне цитафат-коррекции. При пролонгированном применении цитафата существенно повысился выход ШО, что указывает на благоприятную для организма тенденцию завершенности ПОЛ, “тушению” цепных реакций. Недельное применение препарата способствовало противоположному эффекту. Содержание ШО снизилось в 3 раза, при этом, как отмечалось выше, уровень вторичных, токсических продуктов ПОЛ возрос, то есть непродолжительное применение цитафата не позволило добиться стабилизации системы ОМ.

Следует отметить положительное воздействие препарата на все исследуемые ферменты антиоксидантной защиты: в обеих опытных группах отмечена нормализация активности КАТ и ГПО, кроме того, в 3-й группе нормализовалась активность АДА, тогда как во 2-й группе она лишь имеет тенденцию к повышению по сравнению с контролем.

В эритроцитах крыс 3-й группы сравнения отмечено достоверное, по сравнению с контролем, повыше-

ние уровня метаболитов ПОЛ. Однако от остальных контрольных групп эта группа не имеет достоверных отличий, что позволяет говорить о состоянии гетеростаза, в котором находятся эти животные. При этом система ОМ работает на грани сбоя, который может произойти в любой момент. У крыс 3-й группы сравнения можно отметить прогрессирование накопления СМ, а также 2-кратное по сравнению с нормой снижение уровня ШО, что говорит о дальнейшем разветвлении патологического процесса.

В плазме этих животных наблюдается прогрессирующее накопление метаболитов ПОЛ: концентрация МДА увеличена вдвое, а концентрация ДК — в 6 раз, по всей видимости, за счет элиминации через почки. Это подтверждается приростом их содержания в плазме.

В системе АОЗ у крыс 3-й группы сравнения заметно достоверное повышение активности ГПО (на 30 %) при практически неизменной активности КАТ. Многие авторы объясняют этот факт снижением генерации СОА, в результате чего эффективной становится работа ГПО, так как работа КАТ эффективна только при больших количествах СОА. Вместе с этим активность АДА тоже повышается, что, по-видимому, может быть связано с приспособительными возможностями организма.

Кроме того, отмечен гипогликемический эффект цитафата (таблица) во всех группах. Он менее значителен, чем антиоксидантный эффект препарата (препарат РК “Средство для снижения уровня гликемии”).

## ВЫВОДЫ

1. В крови крыс при аллоксановом диабете имеет место интенсификация процессов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белка при практически постоянно повышенном уровне генерации супероксид-анионов; тяжесть этих процессов коррелирует с уровнем гликемии, длительностью диабета и, следовательно, проявлением его сосудистых осложнений, в частности диабетической нефропатии.

2. Цитафат в дозе 100 мг/кг существенно снижает интенсивность процессов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белка, нормализует уровень генерации супероксид-анионов и активность ферментов антиоксидантной защиты.

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. П. Агуреев, Е. И. Синауридзе, М. С. Гюрик и др., *Вопр. мед. хим.*, № 1, 29 – 31 (1992).
2. А. А. Айтуллина, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Караганда (1998).
3. С. Н. Власова, Е. И. Шабунина, И. А. Переслегина, *Лаб. дело*, № 8, 19 – 21 (1990).
4. В. Б. Гаврилов, М. И. Мешкорудная, *Лаб. дело*, № 3, 33 – 36 (1983).
5. М. С. Гончаренко, А. М. Латипова, *Лаб. дело*, № 1, 60 – 61 (1985).
6. Г. Б. Дуанбекова, Е. А. Алимбаев, *Медицина и экология*, № 2, 63 – 72 (1999).
7. Е. Е. Дубинина, И. В. Шугалей, *Усп. совр. биол.*, Вып. 1, **111**, 71 – 81 (1993).
8. Е. Е. Дубинина, И. В. Шугалей, *Вопр. мед. хим.*, № 1, 24 – 26 (1995).
9. А. С. Ефимов, Ш. Г. Науменко, *Пробл. эндокринолог.*, № 1, 6 – 9 (1985).
10. А. Н. Ковалевский, О. Е. Нифантьев, *Лаб. дело*, № 10, 35 – 39 (1990).
11. Э. Н. Коробейникова, *Лаб. дело*, № 7, 8 – 10 (1989).
12. М. А. Королук, Л. И. Иванова, Н. Т. Майорова, *Лаб. дело*, № 1, 16 – 19 (1988).
13. В. И. Корчин, *Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции, Секция 1 – 3, Ч. 1.*, 251 – 254 (2000).
14. Е. И. Львовская, И. А. Волчегорский, С. Е. Шемяков, и др., *Вопр. мед. химии*, № 4, 93 – 95 (1991).
15. Л. М. Мажуль, *Вопр. мед. химии*, № 2, 41 – 43 (1987).
16. И. Б. Немечек, Б. Л. Лурье, Б. Т. Величковский, *Бюл. экпер. биол.*, № 7, 53 – 55 (1991).
17. М. И. Омаралиев, Н. У. Танкибаева, Л. Е. Муравлева и др., *Медицина и экология*, № 2, 61 – 66 (1998).
18. Ш. В. Сулейменова, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Караганда (1997).
19. В. Н. Ушкалова, Г. Д. Кадочникова, *Бюл. экпер. биол.*, № 5, 571 – 573 (1987).
20. М. А. Юрина, О. А. Адейкина, *Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции. Секция 1 – 3. Ч. 1.*, 275 – 277 (2000).
21. Т. Shiba, E. Maehata, and S. Suzuki, *Diabetologia*, Vol. Suppl.40, № 7, 435 (1997).
22. C. Wotata and Z. Jozwiak, *Bull. Pol. Acad. Sci. Biol. Sci.*, **40**(3), 1 – 11 (1992).

Поступила 05.09.03.

## THE INFLUENCE OF CYTAPHATE ON THE STATUS OF OXIDATIVE METABOLISM IN RATS WITH DIABETIC NEPHROPATHY

V. B. Molotov-Luchansky<sup>1</sup>, S. S. Kudryavtsev<sup>2</sup>, L. E. Muravlyova<sup>2</sup>, A. M. Gazaliev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Karaganda state Medical Academy, ul. Gogolya 40, Karaganda, 470061 Kazakhstan

<sup>2</sup> Research Institute of Organic Synthesis and Carbochemistry, Academy of Sciences of Kazakhstan Republic, Karaganda, 470061 Kazakhstan

The antioxidant effect of cytaphate (0,0-dimethyl-N-cytisinyl phosphate) has been studied in outbred white rats with alloxan-induced insulin-dependent diabetes mellitus. The content of malonic dialdehyde, diene conjugates, ketodienes, middle-weight molecules, primary and secondary products of lipid peroxidation (LPO), and Schiff bases and the activity of catalase, glutathione peroxidase, and adenosine deaminase in erythrocytes have been evaluated. The state of oxidative protein modification, the content of malonic dialdehyde and diene conjugates, and the superoxide-anion production in the blood plasma have been determined. In the blood of animals with model diabetes, the LPO and oxidative protein modification processes were intensified and the level of superoxide anion production was increased. The administration of cytaphate led to a decrease of the LPO intensity and oxidative protein modification and to normalization of the level of superoxide anion production and the activity of enzymes involved in the antioxidant protection system.