

УДК 577.113.3:612:36

АДЕНІЛОВІ НУКЛЕОТИДИ В ТКАНИНАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ АЛОКСАН"- "ІНДУКОВАНОГО ДІАБЕТУ

Майданюк А.В., Данченко Н.М., Весельський С.П.

*Навчально"- "науковий центр «Інститут біології» Київський національний університет
імені Тараса Шевченка.*

E-mail: spvesel@ukr.net

Досліджено окремі показники енергетичного обміну в тканинах печінки, підшлункової залози та крові щурів за умов алоксан - індукованого (150 мг/кг) цукрового діабету. За допомогою тонкошарової хроматографії показано, що за даних умов в тканині печінки та підшлункової залози зменшується рівень АТФ та значно зростає концентрація АДФ і АМФ. Розрахунки коефіцієнта співвідношення концентрації АТФ/АДФ та енергетичного заряду виявили більш суттєві зміни в енергетичному обміні в досліджуваних тканинах при модулюванні цукрового діабету за допомогою алоксану. Це було додатково підтверджено іншими методами дослідження при аналізі продуктів катаболізму аденілових нуклеотидів, зокрема сечової кислоти, ксантину, інозину, аденозину та інозинмонофосфату. Рівень окремих з них зростав у 2 – 4 рази в крові та тканинах піддослідних тварин порівняно з контрольними. Виявлені нами зміни в досліджуваних тканинах при алоксан - індукованому діабеті вказують на перемикання метаболізму в низькоенергетичний стан.

Ключові слова: алоксан, діабет, аденілові нуклеотиди, сечова кислота.

ВСТУП

Діабет "—" хронічне захворювання, яке веде до порушення вуглеводного, ліпідного та білкового обмінів через суттєве зниження можливості засвоєння глюкози більшістю тканин організму людини [1]. Відомо, що основним енергетичним субстратом в клітинах є глюкоза. При експериментальному алоксан"- "індукованому діабеті тканинам бракує глюкози. Механізмом адаптації до даного стану організму є інтенсифікація гліюконеогенезу [2], який має особливо важливе значення для печінки, котра є одним із основних метаболічно активних органів і бере участь в підтриманні концентрації глюкози в крові людини і тварин.

Співвідношення між процесами катаболізму і анаболізму глюкози в клітинах печінки знаходиться під контролем багатьох факторів регуляції, в тому числі концентрації метаболітів перетворення глюкози, нуклеотидів, певних гормонів та медіаторів [3, 4]. Зазначимо, що рівень глюкози в крові є одним із найбільш контрольованих фізіологічних показників, оскільки вона необхідна для нормального функціонування всіх органів та тканин. Однак, для цукрового діабету характерною є гіперглікемія, котра розвивається не лише внаслідок зменшення утилізації глюкози тканинами, але й збільшення виходу в кров при утворенні її в печінці з молочної кислоти [5].

Виявлені порушення метаболізму сприяють розвитку патологічного стану і можуть знижувати ефективність енергетичного обміну в різних тканинах організму.

Метою даної роботи було оцінити вміст аденілових нуклеотидів в тканині печінки та підшлункової залози за умов алоксан"-індукованого діабету.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проводили на статевозрілих щурах масою 200 – 220 г. Тварин утримували на повному харчовому раціоні. Всі експерименти виконували у відповідності до вимог комісії з біоетики (протокол №12 від 25.12.2009) та «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах» (Київ, 2001), що узгоджується з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Модель експериментального цукрового діабету створювали одноразовим підшкірним введенням алоксану моногідрату ("Sigma") у розчині ацетатного буферу із розрахунку 150 мг препарату на один кілограм ваги тварин. Контрольним тваринам аналогічним чином була введена відповідна кількість ацетатного буферу.

Для екстракції нуклеотидів заморожені у рідкому азоті тканини печінки та підшлункової залози щурів гомогенізували. Вільні нуклеотиди екстрагували впродовж 25 – 30 хв при температурі 0 – 4 °С в розчині 0,8М HClO₄. Для одержання безбілкових перхлоратних екстрактів гомогенат центрифугували впродовж 15 хв при 1500 об/хв (центрифуга Опн – 3V42). Відібрану надосадову рідину нейтралізували K₂CO₃ до значення рН 7,0 і повторно центрифугували за тих же умов. Після цього аліквоти надосадової рідини наносили на хроматографічні пластинки [7].

Розділення та кількісне визначення аденіннуклеотидів на силуфолових пластинках UV– 254 здійснювали за раніше описаним методом [8]. Денситометрію пластин при їх UV(260 нм) опроміненні здійснювали за допомогою денситометра CS – 920 "Shimadzu" (Японія). Вміст досліджуваних сполук (АМФ, АДФ та АТФ) у хроматографічних плямах визначали за допомогою калібрувальних кривих. Разом з тим, на даних хроматограмах були виявлені та ідентифіковані інші метаболіти пуринового обміну. Окрім цього були проведені розрахунки співвідношень компонентів аденілової системи та енергетичного потенціалу в досліджуваних тканинах. Одночасно в сироватці крові щурів (на дев'ятий день після введення алоксану) визначали наступні біохімічні показники: рівень вільної глюкози, креатиніну, сечової кислоти, а також вміст вільного фосфору та активність лужної фосфатази за допомогою автоматичного біохімічного аналізатора "FlexoXL" "SebetaXL" (Голландія). Статистичну обробку отриманих даних проводили параметричним методом (Statistica – 6) із використанням t-критерію Ст'юдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Зазначимо, що біохімічні характеристики плазми крові щурів, взятої на дев'ятий день після введення алоксану, в значній мірі відповідають стану цукрового діабету. Зокрема, встановлено різке зростання рівня глюкози в плазмі крові

піддослідних щурів у 5,6 разів ($p < 0,01$), котрий сягав 35,78 ммоль/л ($p < 0,01$), тоді як в інтактних тварин ця величина складала лише $6,28 \pm 0,31$ ммоль/л.

Тканину печінки та підшлункової залози було взято в дослід після відбору проб жовчі та ресстрації динаміки холерезу. Аналіз даних тканин на вміст компонентів аденілової системи показав суттєві відмінності як в кількості, так і у співвідношенні даних метаболітів в контрольних та піддослідних тварин. (Табл.№1). Зокрема, найсуттєвіша різниця виявилась у зміні концентрації АДФ, рівень якого в тканині печінки щурів з алоксан"-індукованим діабетом зріс на 77,8% ($p < 0,05$), а в тканині підшлункової залози ця різниця складала 134,8% ($p < 0,05$). Одночасно в тканині печінки рівень АМФ зріс значно більше – на 184,9% ($p < 0,01$) порівняно з контролем.

Таблиця 1
Вміст аденіннуклеотидів в тканинах щурів (мкмоль/г)

		АТР	АДР	АМР	□(АТР+АДР+АМР)	АТР/АДР	Енергетичний заряд (ЕЗ)
Підшлункова залоза	Контроль	1,22±0,12	0,23±0,06	0,81±0,25	2,26±0,14	5,30	0,591
	Алоксан	1,07±0,09 88,7%	0,54±0,11 234,8%	0,93±0,24 114,8%	2,55±0,15 112,8%	1,98 2,68 раза	0,526 89,0%
Печінка	Контроль	0,74±0,12	0,27±0,11	0,44±0,09	1,45±0,11	2,74	0,603
	Алоксан	0,55±0,11 74,3%	0,48±0,17 177,8%	1,25±0,19 284,9%	2,28±0,16 157,2%	1,15 2,38 раза	0,346 57,4%

Примітка: (M ±m; n=9), (% від контрольних значень)

ЕЗ= АТР + 0,5 АДР/ АТР + АДР + АМР

Слід відзначити, що при такій схемі експерименту концентрація АТФ в досліджуваних тканинах була невисокою, але при алоксановому навантаженні організму щурів вона подальше знижувалась в тканині печінки на 25,7% ($p < 0,05$) і підшлункової залози на 11,3% ($p < 0,05$) порівняно з контрольними тваринами. Однак, зміни коефіцієнта співвідношення концентрації АТФ/АДФ виявилися більш

суттєвими і в тканині печінки він був у 2,38 рази ($p < 0,01$) меншим, ніж в контролі. Аналогічні зміни по цьому показнику встановлено і для тканини підшлункової залози (2,68) рази ($p < 0,01$) (таблиця 1). Розрахунки енергетичного заряду підтвердили наявність суттєвих змін в енергетичному обміні в досліджуваних тварин при модулюванні цукрового діабету за допомогою алоксану.

З іншого боку, визначення продуктів перетворення аденілових нуклеотидів, включаючи сечову кислоту та неорганічний фосфор в крові та досліджуваних тканинах, явно вказувало на значне підсилення катаболічних процесів в організмі щурів. Так, концентрація сечової кислоти в крові зросла на 155,9% ($p < 0,05$), а в тканині печінки та підшлункової залози значно більше – на 334,1% ($p < 0,01$) та 265,8% ($p < 0,01$) відповідно. Окрім цього, варто звернути особливу увагу на зміну рівня проміжних продуктів катаболізму аденілових нуклеотидів у досліджуваних тканинах щурів з алоксан"-індукованим діабетом (таблиця 2), оскільки у деяких з них, особливо в тканині підшлункової залози, концентрація зростала від двох до майже семи разів і в тканині печінки мало що менше. Це в цілому свідчило про крайні метаболічні перевантаження в організмі піддослідних щурів.

Таблиця 2

Продукти катаболізму аденілових нуклеотидів в тканинах щурів

	ІМФ	Аденозн	Інозин	Ксантин	Сечова кислота
Підшлункова залоза	683,4*	613,1*	580,8*	260,3*	265,8*
Печінка	256,8*	148,8*	260,3*	112,7*	334,1*

Примітка: (n=9),*- $p < 0,05$, % від контрольних значень

Зазначимо, що катаболізм інозинмонофосфату (ІМФ) і подальше окислення його до гіпоксантину і сечової кислоти супроводжується утворенням супероксидіонрадикалу, що ініціює процеси перекисного окислення [2]. Окислення SH- груп цистеїну в молекулі ферменту призводить до підвищення активності АМФ-дезамінази і ксантиноксидази. Тобто, збільшення активності АМФ-дезамінази і ксантиноксидази може бути однією з причин і одночасно наслідком активації окисного стресу у тканинах щурів за умов цукрового діабету.

Разом з тим, це створює умови для переходу обміну речовин в тканинах в низькоенергетичний стан, який характеризується пониженими значеннями концентрації АТФ, а отже пул аденілатів розряджений і присутні вони, головним чином, у формі АМФ (Таблиця №1). Експериментально на різних об'єктах показано, що «перемикання» метаболізму в низькоенергетичний стан зазвичай супроводжується дезамінуванням АМФ до ІМФ [6]. Виявлені зміни енергетичного обміну в тканині підшлункової залози та печінки зумовлюють зниження функціональних можливостей даних органів по відношенню до регуляції глікемії.

Таким чином, в результаті проведеного дослідження встановлено, що у досліджуваних тварин спостерігається зниження концентрації АТФ, енергетичного

аденілатного заряду (потенціалу) Атоінсана, зростання рівня АМФ та проміжних і кінцевих продуктів катаболізму аденілових нуклеотидів, що свідчить про розвиток енергодифіцитного стану в даних органах за умов алоксан"-індукованого діабету.

ВИСНОВКИ

1. Алоксан, застосований підшкірно у дозі 150 мг/кг маси тіла, збільшує концентрацію глюкози та сечової кислоти у крові щурів.
2. При розвитку алоксан"-індукованого діабету в тканині печінки та підшлункової залози знижується рівень АТФ та значно зростає концентрація АДФ та АМФ.
3. Встановлено зниження величини енергетичного заряду (потенціалу) Атоінсана та значного зростання рівня продуктів катаболізму аденілових нуклеотидів в тканині печінки та підшлункової залози за умов моделювання цукрового діабету.

Список літератури

1. Марилам В.Дж. Клиническая биохимия / Марилам В.Дж. – Издательство «Бином – Невский диалект» – 2003. – 368с.
2. Дмитренко А.П. Пуриновый обмен и его регуляция в лимфоцитах. / Дмитренко А.П. – АН Украины, Ин-т биохимии им. А.В. Палладина, 1991. – 197 с.
3. Ralph A. DeFronzo. Regulation of hepatic glucose metabolism in human diabetes / Ralph A. DeFronzo. // Metabolism Reviews.- 1987.- Vol. 3, No. 2. – P. 415 – 459.
4. Foufelle F. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role of the transcription factor sterol regulatory element binding protein / F. Foufelle, P. Ferre // 1с.Biochem. J.- 2002.- Vol. 366, P. 377 – 391.
5. Hua V. Lin. Hormonal regulation of hepatic glucose production in health and disease. / V. Lin Hua, Accili Domenico. // Cell Metabolism.- 2011.-Vol.14.- P. 9–19.
6. Медведева Н.Б. Влияние гипергликемии на состояние энергетического и азотистого обмена в печени крыс с экспериментальным сахарным диабетом. : авт.канд.дис., спец. 03.03.01 – физиология). / Медведева Н.Б. – Ярославль – 2012.- 18 с.
7. Майданюк А.В. Методичні аспекти ТШХ аденілових нуклеотидів на силікагелі. / Майданюк А.В. // Вісник КНУ, біологія – 2002.- Вип. 36 – 37.- С. 96–97.
8. Майданюк А.В. Визначення компонентів аденілового ряду методом денситометрії хроматограм в ультрафіолетовому світлі. / Майданюк А.В. // Вісник КНУ, біологія – 2004.- Вип. 42 – 45.- С. 12–13.

Майданюк А.В. Адениловые нуклеотиды в тканях крыс в условиях аллоксан"-индуцированного диабета / А.В. Майданюк, Н.М. Данченко, С.П. Весельский // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2013. – Т. 26 (65), № 4. – С.94-100.

Проведено дослідження окремих показателів енергетичного обміну в тканинах печінки, підшлункової залози та крові щурів з цукровим діабетом, індуктованим алоксаном (150 мг/кг). С допомогою тонкошарової хроматографії показано, що при даних умовах в тканинах печінки та підшлункової залози знижується рівень АТФ і суттєво збільшується концентрація АДФ і АМФ. Розрахунки коефіцієнта співвідношення концентрації АТФ/АДФ і енергетичного заряду показали більш суттєві зміни в енергетичному обміні досліджуваних тканин при моделюванні цукрового діабету з допомогою алоксана. Це було також підтверджено іншими методами дослідження при аналізі продуктів катаболізму аденилових нуклеотидів, в тому числі мочевої кислоти, ксантина, инозину, аденозину і инозинмонофосфату. Рівень окремих з них збільшився в 2 – 4 рази в крові і тканинах експериментальних тварин порівняно з контрольними

показателями. Обнаруженные нами изменения в исследуемых тканях при аллоксан-индуцированном сахарном диабете указывают на переключение метаболизма в низкоэнергетическое состояние.

Ключевые слова: аллоксан, диабет, адениловые нуклеотиды, мочевая кислота.

ADENYL NUCLEOTIDES IN THE RAT TISSUES IN ALLOXAN-INDUCED DIABETES

Maidaniuk A.V., Danchenko N.M., Veselsky S.P.

Kyiv National University after Taras Shevchenko

E-mail: spvesel@ukr.net

Some indexes of energy metabolism in the liver, pancreas tissues and blood of rats were investigated in alloxan-induced diabetes. Investigation was carried out using the rats (male) of 200 – 220 gramme. The animals were fed by the complete alimentary diet. The model of the experimental diabetes was set up by single injection of alloxan monohydrate (“Sigma”) subcutaneously in acetate buffer solution in dose of 150 mg of preparation per one kilogramme of the body weight. The control animals were injected with the same volume of acetate buffer solution. The free nucleotides were extracted during 25 - 30 minutes in 0,8 M HClO₄ at 0 – 4 °C. To obtain protein free supernatant fraction homogenate was centrifugated during 15 minutes at 1500 rpm in centrifuge (Opn – 3V42). Supernatant was than neutralized with K₂CO₃ to pH7,0 and centrifugated once more at the same parametres. The aliquots from this preparation were spotted to Silufol UV-254 chromatography plates [7]. Separation and quantitative estimation of the adenyly nucleotides on the plates were done according to the method described earlier [8]. Densitometry of the plates was carried out at their irradiation by UV (260 nm) rays with the help of CS – 920 densitometre (“Shimadzu” Japan). Simultaneously, on the ninth day following alloxan injection, the next biochemical substances were determined in the blood serum of the rats: concentration of free glucose, creatinine, uric acid and also free phosphores and activity of alkaline phosphatase with the help of automatic biochemical analyser “FlexorXL” “SebetaXL” (Netherlands). It was shown, with the help of the thin-layer chromatography, that level of ATP in the liver and pancreas tissues was reduced, whereas concentration of ADP and AMP increased substantially in the rats in diabetes provoked by alloxan. Calculations of ratio coefficient of ATP/ADP concentrations and energy charge have revealed more essential changes in energy exchange in investigated tissues in modulation of diabetes by alloxan. It was additionally confirmed by the other methods of investigation during analysis of catabolism products of the adenyly nucleotides, including uric acid, xanthine, inosine, adenosine and inosinemonophosphate. So, concentration of uric acid increased in the blood by 155,9% (p < 0,05), but much more higher in the liver, and pancreas tissues by 334,1% (p < 0,01) and 265,8% (p < 0,01) correspondingly. Concentration of xantine in the pancreatic gland increased 2,6 times (p < 0,05), inosine – 5,8 (p < 0,01), adenosine more than 6 (p < 0,01) and inosinemonophosphate almost 7 times (p < 0,001). Level of the intermediate metabolits of adenyly system components alteration in the liver tissue, that is characterized by more intensive metabolism, turned to be considerably higher for the animals suffered from the

diabetes induced by alloxan. So, concentration of inosine and inosinemonophosphate in this tissue exceeded more than twice (2,5) ($p < 0,05$) such of the control values. The changes revealed in the investigated tissues in the condition of alloxan"-induced diabetes point at metabolism switching to the low energy state.

Keywords: alloxan, diabetes, adenyl nucleotides, uric acid.

References

1. Merilam V. Dj. Clinical biochemistry, 368 p., publishing house ("Binom – Nevskiy dialect" 2003).
2. Dmitrenko A.P. Purine metabolism and its regulation in hepatocytes. NAS Ukraine, Institute of Biochemistry named after A.V.Palladin, K. 1991. 197 p.
3. Ralph A. DeFronzo. Regulation of hepatic glucose metabolism in humans. diabetes/ Metabolism Reviews.- 1987.- Vol. 3, No. 2, P. 415 – 459.
4. Fougelle F., Ferre P. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role of the transcription factor sterol regulatory element binding protein – 1c. Biochem. J.- 2002.- Vol. 366, P. 377 – 391.
5. Hua V. Lin, Domenico Accili. Hormonal regulation of hepatic glucose production in health and disease. Cell Metabolism. - 2011.-Vol. 14.-P. 9 – 19.
6. Medvedeva.N.B. Impact of hyperglycemia on the condition of energy and nitrite metabolism in treatment of rats with experimental diabetes. – Ph thesis (03.03.01 – physiology).Yaroslavl– 2012.- 18 p.
7. MaidaniukA.V.Methodical aspects of the ThLC of adenyl nucleotides on silicagel. Visnik KNU, biology – 2002. Issue 36 – 37.-P. 96 – 97.
8. MaidaniukA.V. Assessment of adenyl series components by chromatogram densytometry in ultraviolet light. Visnik KNU, biology – 2004. Issue 42 – 45. P. 12 – 13.

Поступила в редакцію 19.11.2013 з.