



Особенности динамики показателей окислительной модификации белков и активность каталазы в плазме крови у потомков самок с экспериментальным гестационным диабетом в зависимости от пола, возраста и уровня базальной гликемии

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: каталаза, гликемия, экспериментальный гестационный диабет.

С целью изучить особенности динамики показателей окислительной модификации белков и активность каталазы в плазме крови у крыс линии Вистар, потомков самок с экспериментальным гестационным диабетом, в зависимости от пола, возраста и уровня базальной гликемии проведено исследование на 160 животных. Определяли концентрацию глюкозы глюкозооксидазным методом, степень окислительной модификации белков плазмы по методу В. Halliwell, уровень альдегидфенилгидразонов и кетонфенилгидразонов. Установлено, что у потомков самок с экспериментальным гестационным диабетом концентрация кетонфенилгидразонов в плазме крови практически достигает концентрации альдегидфенилгидразонов, что, возможно, свидетельствует о «срыве» резервно-адаптационных возможностей организма. Данные процессы происходили на фоне достоверного снижения активности антиоксидантной системы. Более выраженные нарушения наблюдали у самцов, потомков самок с экспериментальным гестационным диабетом; они развивались параллельно с нарушениями в углеводном и жировом обменах и прогрессировали с возрастом.

Особливості динаміки показників окислювальної модифікації білків та активності каталази у плазмі крові в нащадків самиць з експериментальним гестаційним діабетом залежно від статі, віку та рівня базальної глікемії

О. В. Ганчева

З метою вивчити особливості динаміки показників окислювальної модифікації білків та активність каталази у плазмі крові у щурів лінії Вістар, нащадків самок з експериментальним гестаційним діабетом, залежно від статі, віку та рівня базальної глікемії здійснили дослідження на 160 тваринах. Визначали концентрацію глюкози глюкозооксидазним методом, ступінь окислювальної модифікації білків плазми за методом В. Halliwell, рівень альдегідфенілгідразонів і кетонфенілгідразонів. Встановлено, що у нащадків самиць з експериментальним гестаційним діабетом концентрація кетонфенілгідразонів у плазмі крові майже досягає концентрації альдегідфенілгідразонів, що, можливо, свідчить про «зрив» резервно-адаптаційних можливостей організму. Ці процеси перебігали на тлі вірогідного зниження активності антиоксидантної системи. Більш значні порушення спостерігали в самців, нащадків самок з експериментальним гестаційним діабетом; вони розвивалися паралельно із порушеннями у вуглеводному та жировому обміні і прогресували з віком.

Ключові слова: каталаза, глікемія, експериментальний гестаційний діабет.

Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2015. – № 1 (17). – С. 77–81

Peculiarities of oxidative modification of proteins indices in blood plasma of the female rats' offspring with experimental gestational diabetes depending on sex, age and basal glycemia level

O. V. Gancheva

Aim. Peculiarities of oxidative modification of proteins indices and catalase activity of the female rats' offspring with experimental gestational diabetes have been studied experimentally.

Methods and results. It is established that concentration of ketone phenylhydrazone (the later sign of oxidative protein injury) markedly reaches the concentration of aldehyde phenylhydrazone.

Conclusion. It may probably identify disruption of reserve compensatory abilities of the organism. At the same time reliable decrease of antioxidative system activity has been observed. Male offspring of rats with experimental gestational diabetes demonstrated more expressed disturbances along with alterations of carbohydrate and lipid metabolism, which increases with the age.

Key words: Catalase, Blood Glucose, Animal Experimentation, Gestational Diabetes.

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2015; № 1 (17): 77–81

Известно, что любой адаптивный или патологический процесс протекает на фоне образования активных форм кислорода (АФК) и усиления свободно-радикального окисления биосубстратов [1]. В ответ на это происходит активизация антиоксидантной системы (АОС). Ее представляют низкомолекулярные соединения – ловушки радикалов, к которым относятся витамины

(А, С, Е, К), биофлавоноиды, низкомолекулярные тиолы (глутатион и эрготионеин), а также антиперекисные ферменты (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, каталаза и др.) [2,3]. Конечный результат процесса адаптации – приспособление организма к новым условиям окружающей среды или срыв адаптивных механизмов. Следствием этого является раз-

вите патологического состояния, определяемое в итоге взаимоотношением антиоксидантных и прооксидантных механизмов, иными словами, способностью АОС защитить клетку от свободных радикалов и перекисей [4]. В специализированной литературе накоплены многочисленные данные, касающиеся изучения механизмов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и его роли в нормальном и патологическом функционировании клеток, однако АФК вызывают и окислительную модификацию белков (ОМБ), или, как ее еще называют, перекисное окисление белков [5].

В нашем эксперименте анализ соотношения содержания продуктов ОМБ и активности каталазы плазмы позволит оценить состояние показателей оксидативного стресса в организме нормальных животных и потомков самок с экспериментальным гестационным диабетом (ЭГД). Это даст возможность предположить их роль в тех или иных перестройках организма, направленных на активацию защитно-приспособительных механизмов на клеточном уровне и его гомеостатических систем в целом, установить ее нарушение у животных с пренатально воздействующим негативным фактором – хронической гипергликемией.

Цель работы

Изучить особенности динамики показателей окислительной модификации белков и активность каталазы в плазме крови у крыс линии Вистар, потомков самок с ЭГД, в зависимости от пола, возраста и уровня базальной гликемии.

Материалы и методы исследования

Исследование проведено на 80 самках и самцах, потомков самок с нормально протекающей беременностью, возрастом 2, 4, 6 и 18 месяцев, и 80 самках и самцах, потомков самок с ЭГД [6], по 20 животных в каждой группе. Животные находились на стандартном рационе при свободном доступе к воде и пище. При достижении соответствующего возраста животных декапитировали под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг). Во всех группах

животных определяли концентрацию глюкозы глюкозо-оксидазным методом.

Для оценки интенсивности свободно-радикального окисления в плазме крови экспериментальных животных определяли степень ОМБ по методу В. Halliwell [5]. Определяли уровень альдегидфенилгидразонов (АФГ), которые относят к ранним маркерам окисления белков, и кетонфенилгидразонов (КФГ), которые рассматривают как поздние маркеры деструкции белковой молекулы. При определении спонтанной ОМБ АФГ и КФГ свидетельствовали об общей направленности свободно-радикальных процессов окисления в организме, тогда как при стимулированной ОМБ – характеризовали его резервно-адаптационные возможности.

Состояние антиоксидантной системы оценивали по активности каталазы, величину которой в плазме крови определяли спектрофотометрически [7].

Все полученные экспериментальные данные обрабатывали на персональном компьютере пакетом прикладных и статистических программ VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, ФРГ), EXCEL из пакета MS Office 2007 (Microsoft Corp., США), пакета STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001). Для всех показателей рассчитывали значение средней арифметической выборки (M), ее дисперсии и ошибки средней (m). Для установления достоверности различий результатов исследований в опытных и контрольных группах животных определяли коэффициент Стьюдента (St), после чего определяли вероятность различия выборок (p) и доверительный интервал средней по таблицам распределения Стьюдента. Достоверными считали значения, для которых $p_{St} < 0,05$ [8].

Результаты и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что у контрольных животных независимо от пола с возрастом происходит достоверное снижение активности каталазы в плазме (табл. 1). Однако у самок к старости активность фермента возрастает на 12% ($p_{St} < 0,05$), а у самцов остается стабильной.

Таблица 1

Возрастная динамика показателей окислительной модификации белка и активность каталазы в плазме крови у контрольных самцов и самок крыс линии Вистар (M±m)

Серии	Каталаза, мкат/мл	Показатели степени ОМБ			
		Спонтанная, у.ед./мг		Стимулированная, у.ед./мг	
		АФГ	КФГ	АФГ	КФГ
Самцы, 2 мес.	170,2±3,31	33±1	29±1	119±3	52±1
Самки, 2 мес.	160,6±4,22	29±1 ³	25±1 ³	140±5 ³	47±3
Самцы, 4 мес.	130,6±4,3 ¹	33±1	28±1	158±4 ¹	63±2 ^{1,3}
Самки, 4 мес.	141,5±5,5 ²	31±2	27±1	152±3 ²	69±2 ²
Самцы, 6 мес.	117,3±2,1 ^{1,3}	58±4 ¹	45±3 ¹	146±7 ³	73±2 ¹
Самки, 6 мес.	91,9±3,03 ²	51±2 ²	41±2 ²	114±6 ²	74±2
Самцы, 18 мес.	115,4±4,9 ³	59±2 ³	57±3 ^{1,3}	139±3 ³	68±4
Самки, 18 мес.	102,4±4,2 ²	53±2	49±2 ²	125±4	71±3

Примечания: ¹ – достоверные отличия параметров ($p_{St} < 0,05$) в группах самцов по отношению к группе предыдущего возраста; ² – достоверные отличия параметров ($p_{St} < 0,05$) в группах самок по отношению к группе предыдущего возраста; ³ – достоверные отличия параметров ($p_{St} < 0,05$) в группах самцов по отношению к группе самок того же возраста.

Снижение активности антиперекисного фермента каталазы сопровождается у 4-месячных самцов увеличением концентрации АФГ и КФГ (при стимулированной ОМБ) на 21% ($p_{St} < 0,05$) и 33% ($p_{St} < 0,05$) соответственно (табл. 1). К 6-месячному возрасту как у самок, так и у самцов на фоне снижения активности каталазы отмечено увеличение содержания модифицированных белковых молекул. У самцов при спонтанной ОМБ АФГ и КФГ – на 36% ($p_{St} < 0,05$) и в 2 раза ($p_{St} < 0,05$) и, соответственно, при стимулированной – КФГ на 16% ($p_{St} < 0,05$).

У самок в этом возрастном периоде происходит увеличение АФГ и КФГ на 32% ($p_{St} < 0,05$) и 89% ($p_{St} < 0,05$) соответственно при спонтанной ОМБ; на 9% ($p_{St} < 0,05$) и 47% ($p_{St} < 0,05$) при стимулированной ОМБ (табл. 1). К 18 месяцам жизни у самок увеличивается накопление КФГ при спонтанной ОМБ на 17% ($p_{St} < 0,05$), а у самцов – на 27% ($p_{St} < 0,05$) (табл. 1).

Анализ возрастного состояния показателей оксидативного стресса показал динамичность состояния системы. Установлено, что в процессе жизни животного происходит достоверное снижение активности каталазы и, вероятно, других ферментов антиоксидантной защиты на фоне увеличения концентрации окислительно модифицированных белков в плазме. Наиболее выраженные изменения в системе отмечены у животных в периоды

гормональных перестроек, они зависят от интенсивности процессов метаболизма и адаптационных возможностей.

Используемую в нашем эксперименте модель хронической гипергликемии плода (ЭГД), большинство авторов рассматривают как модель метаболического стресса как для самки, так и для ее потомства [9]. Следовательно, накопление продуктов окислительной деструкции белков плазмы у потомков самок с ЭГД можно рассматривать как один из ранних индикаторов нарушения молекулярных механизмов оксидативного стресса и маркера окислительной деструкции других молекул (липиды, ДНК) клетки.

Исследования активности каталазы в плазме крови у крыс, потомков самок с ЭГД, показали низкую активность фермента во всех экспериментальных группах не зависимо от пола и возраста. При этом наблюдали прогрессивное снижение активности фермента к 18 месяцам жизни у самок в 1,8 раза ($p_{St} < 0,05$), а у самцов – в 4 раза ($p_{St} < 0,05$) по сравнению с контролем (табл. 2, 3). «Истощение» антиоксидантной системы сопровождалось окислительной деструкцией белковых молекул, о чем свидетельствовало увеличение показателей спонтанного и стимулированного перекисного окисления белков у самок и самцов (табл. 2, 3).

Таблица 2

Возрастная динамика показателей окислительной модификации белка и активность каталазы в плазме крови у самок крыс линии Вистар, потомков самок с ЭГД ($M \pm m$)

Возраст	Серии	Каталаза, мкат/мл	Показатели степени ОМБ			
			Спонтанная, у.ед./мг		Стимулированная, у.ед./мг	
			АФГ	КФГ	АФГ	КФГ
2 мес.	Контроль	160,6±4,22	29±1	25±1	140±5	47±3
	Потомки самок с ЭГД	124,8±3,7 ¹	46±2 ¹	33±1 ¹	211±15 ¹	86±2 ¹
4 мес.	Контроль	141,5±5,5	31±2	27±1	152±3	69±2
	Потомки самок с ЭГД	80,3±5,2 ^{1,2}	38±2 ^{1,2}	31±2	175±3 ^{1,2}	87±2 ¹
6 мес.	Контроль	91,9±3,03	51±2	41±2	114±6	74±2
	Потомки самок с ЭГД	76,25±4,7 ¹	70±4 ^{1,2}	51±3 ^{1,2}	230±9 ^{1,2}	88±3 ¹
18 мес.	Контроль	102,4±4,2	53±2	49±2	125±4	71±3
	Потомки самок с ЭГД	79,2±3,7 ¹	72±3 ¹	53±3	192±7 ^{1,2}	82±3 ¹

Примечания: ¹ – достоверные отличия параметров ($p_{St} < 0,05$) по отношению к контрольной группе; ² – достоверные отличия параметров ($p_{St} < 0,05$) по отношению к группе предыдущего возраста.

Таблица 3

Возрастная динамика показателей окислительной модификации белка и активность каталазы в плазме крови у самцов крыс линии Вистар, потомков самок с ЭГД ($M \pm m$)

Возраст	Серии	Каталаза, мкат/мл	Показатели степени ОМБ			
			Спонтанная, у.ед./мг		Стимулированная, у.ед./мг	
			АФГ	КФГ	АФГ	КФГ
2 мес.	Контроль	170,2±3,31	33±1	29±1	119±3	52±1
	Потомки самок с ЭГД	105,6±3,84 ¹	41±2 ¹	35±2 ¹	212±12 ¹	92±3 ¹
4 мес.	Контроль	130,6±4,3	33±1	28±1	158±4	63±2
	Потомки самок с ЭГД	62,7±3,2 ^{1,2}	43±4 ¹	39±1 ¹	227±8 ¹	121±4 ^{1,2}
6 мес.	Контроль	117,3±2,1	58±4	45±3	146±7	73±2
	Потомки самок с ЭГД	64,5±3,4 ¹	74±3 ^{1,2}	49±2	229±7 ¹	86±3 ^{1,2}
18 мес.	Контроль	115,4±4,9	59±2	57±3	139±3	68±4
	Потомки самок с ЭГД	42,4±3,5 ^{1,2}	86±4 ^{1,2}	79±2 ^{1,2}	262±12 ^{1,2}	92±5 ¹

Примечания: ¹ – достоверные отличия параметров ($p_{St} < 0,05$) по отношению к контрольной группе; ² – достоверные отличия параметров ($p_{St} < 0,05$) по отношению к группе предыдущего возраста.

Анализируя состояние показателей оксидативного стресса у потомков самок с ЭГД, необходимо отметить, что динамика ОМБ при стрессе зависит не только от биохимических процессов и внешних стрессовых факторов, но и от адаптационных возможностей организма и вида самого воздействия. Многочисленные исследования показали, что иммобилизационный стресс вызывал существенное изменение ОМБ плазмы крови у беременных крыс [10]. По мнению ряда авторов, стресс, перенесенный матерями на разных сроках беременности, в дальнейшем может оказывать неблагоприятное воздействие на различные физиологические функции потомства [11].

Так, у потомков самок с ЭГД концентрация КФГ (более позднего маркера окислительного повреждения белков) в плазме крови практически достигает значения АФГ, что может свидетельствовать о «срыве» резервно-адаптационных возможностей организма у потомков самок с ЭГД. Данные процессы происходили на фоне достоверного снижения активности антиоксидантной системы. Более выраженные нарушения наблюдали у самцов, потомков самок с ЭГД, они развивались параллельно с нарушениями в углеводном и жировом обменах и прогрессировали с возрастом [6,12].

Выводы

У нормальных контрольных животных в процессе жизни происходит достоверное снижение активности

каталазы и, вероятно, других ферментов антиоксидантной защиты на фоне увеличения концентрации окислительно модифицированных белков в плазме. Наиболее выраженные изменения в системе антиоксидантной защиты наблюдают у животных в периоды гормональных перестроек, они зависят от интенсивности процессов метаболизма и адаптационных возможностей. У потомков самок с ЭГД, по сравнению с группами контроля, активность каталазы достоверно ниже во всех возрастных периодах, а концентрация продуктов ОМБ – выше. Концентрация КФГ (более позднего маркера окислительного повреждения белков) у них в плазме практически достигает значения АФГ, что может свидетельствовать о «срыве» резервно-адаптационных возможностей организма. Более выраженные нарушения показателей оксидативного стресса наблюдают у самцов, потомков самок с ЭГД, они развиваются параллельно с нарушениями в углеводном и жировом обменах и прогрессируют с возрастом.

Перспективы дальнейших исследований. Отмеченные особенности состояния показателей оксидативного стресса у животных, перенесших хроническую внутриутробную гипергликемию, позволяют предположить у них нарушения резервно-адаптационных возможностей организма. Изучению этой проблемы будут посвящены дальнейшие исследования.

Список литературы

1. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях (обзор литературы) / Ю.И. Губский, И.Ф. Беленичев, Е.Л. Левицкий и др. // Сучасні проблеми токсикології. – 2005. – №3. – С. 20–26.
2. The effect of weight reduction on antioxidant enzymes and their association with dietary intake of vitamins A, C and E / M. Ramezanipour, M. Jalali, H. Sadrzade-Yeganeh et al. // *Arq Bras Endocrinol Metabol.* – 2014. – Vol. 58. – №7. – P. 744–749.
3. Morin, a flavonoid, on lipid peroxidation and antioxidant status in experimental myocardial ischemic rats / K. S. Numair, G. Chandramohan, M.A. Alsaif [et al.] // *Afr J Tradit Complement Altern Med.* – 2014. – Vol. 11. – №3. – P. 14–20.
4. Non-specific stress-reaction as indicator of radiosensitivity / O.B. Hanzha, N.K. Rodionova, H.A. Dolyns'kyi et al. // *Fiziol Zh.* – 2008. – Vol. 54. – №6. – P. 72–78.
5. Halliwell B. Free Radical in Biology and Medicine / B. Halliwell, M.C. Yutteridge. – Oxford : Clarendon Press, 1999. – 320 p.
6. Ганчева О.В. Биохимические корреляты метаболических нарушений у потомков самок крыс с экспериментальным гестационным диабетом / О.В. Ганчева // *Клінічна та експериментальна патологія.* – 2009. – Т. 8. – №4. – С. 15–19.
7. Метод определения активности каталазы / М.А. Королук, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // *Лабораторная диагностика.* – 1998. – №1. – С. 16–19.
8. Закс Л. Статистическое оценивание / Л. Закс. – М. : Статистика, 1976. – 598 с.
9. Maternal Stress and Behavior Modulate Relationships between Neonatal Stress, Attention, and Basal Cortisol at 8 Months in Preterm Infants / M.T. Tu, R.E. Grunau, J. Petrie-Thomas et al. // *Psychobiol.* – 2007. – Vol. 49. – №2. – P. 150–164.
10. Prenatal Stress Generates Deficits in Rat Social Behavior: Reversal by Oxytocin / P.R. Lee, D.L. Brady, R.A. Shapiro, D.M. Dorsa, J.I. Koenig // *Brain Res.* – 2007. – Vol. 2. – №7. – P. 152–167.
11. Пренатальный стресс и нейроэндокринная патология / А.Г. Резников, В.П. Пишак, Н.Д. Носенко и др. – Черновцы : Медакадемия, 2004. – 320 с.
12. Дисфункция β -клеток панкреатических островков у мужского потомства самок крыс с экспериментальным гестационным диабетом / Ю.М. Колесник, О.В. Ганчева, А.В. Абрамов, А.М. Камышный // *Запорожский медицинский журнал.* – 2007. – Т. 41. – №2. – С. 5–9.

References

1. Gubskij, Yu. I., Belenichev, I. F., Levickij, E. L., Kovalenko, S. I., Gancheva, O. V., Pavlov, S. V., & Marchenko, A. N. (2005) Toksikologicheskie posledstviya okislitel'noj modifikacii belkov pri razlichnykh patologicheskikh sostoyaniyakh (obzor literatury) [Toxicological consequences of protein oxidative modification in different pathological states]. *Suchasni problemy toksykologii*, 3, 20–26. [in Ukrainian].
2. Ramezanipour, M., Jalali, M., Sadrzade-Yeganeh, H., Keshavarz, S. A., Eshraghian, M. R., Bagheri, M., & Emami, S. S. (2014) The effect of weight reduction on antioxidant enzymes and their association with dietary intake of vitamins A, C and E. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 58(7), 744–749.
3. Numair K.S., Chandramohan G., Alsaif M.A., Veeramani, C., & Newehy, A. S. (2014). Morin, a flavonoid, on lipid peroxidation and antioxidant status in experimental myocardial ischemic rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med.*, 11(3), 14–20. doi: 10.4314/ajtcam.v11i3.3.
4. Hanzha, O. B., Rodionova, N. K., Dolyns'kyi, H. A., Kostiukova, L. V., & Druzhyna, M. O. (2008). Non-specific stress-reaction as indicator of radiosensitivity. *Fiziol Zh.*, 54(6), 72–78.

5. Halliwell, B., & Yutteridge, M. C. (1999) *Free Radical in Biology and Medicine*. Oxford : Clarendon Press.
6. Gancheva, O. V. (2009) Biokhimicheskie korrelyaty metabolicheskikh narushenij u potomkov samok kryz s e'ksperimental'nym gestacionnym diabetom [Biochemical correlates of metabolic alteration in offspring of female rats with experimental gestational diabetes] *Klinichna ta eksperimentalna patolohiia*, 8(4), 15–19. [in Ukrainian].
7. Korolyuk, M. A., Ivanova, L. I., Majorova, I. G., & Tokarev, V. E. (1998) Metod opredeleniya aktivnosti katalazy [Detection of catalase activity]. *Laboratornaya diagnostika*, 1, 16–19. [in Russian].
8. Zaks, L. (1976). *Statisticheskoe ocenivanie [Statistical estimation]*. Moscow: *Statistika*. [in Russian].
9. Tu, M. T., Grunau, R. E., Petrie-Thomas, J., Haley, D. W., Weinberg, J., & Whitfield, M. F. (2007) Maternal Stress and Behavior Modulate Relationships between Neonatal Stress, Attention, and Basal Cortisol at 8 Months in Preterm Infants. *Psychobiol.*, 49(2), 150–164. doi: 10.1002/dev.20204.
10. Lee, P. R., Brady, D. L., Shapiro, R. A., Dorsa, D. M., Koenig, J. I. (2007). Prenatal Stress Generates Deficits in Rat Social Behavior: Reversal by Oxytocin. *Brain Res*, 2(7), 152–167. doi: 10.1016/j.brainres.2007.04.042.
11. Reznikov, A. G., Pishak, V. P., & Nosenko, N. D. (2004) *Prenatal`nyj stress i nejroendokrinnaya patologiya [Prenatal stress and neuroendocrine pathology]*. Chernovci: Medakademiya [in Ukrainian].
12. Kolesnik, Yu. M., Gancheva, O. V., Abramov, A. V., & Kamyshnyj, A. M. (2007) Disfunkciya β -kletok pankreaticheskikh ostrovkov u muzhskogo potomstva samok kryz s e'ksperimental'nym gestacionnym diabetom [Dysfunction of pancreatic β -cell in male offspring of female rats with experimental gestational diabetes]. *Zaporozhskij medicinskij zhurnal*, 42(2), 5–9. [in Ukrainian].

Сведения об авторе:

Ганчева О.В., д. мед. н., профессор каф. патологической физиологии, Запорожский государственный медицинский университет, E-mail: Gancheva_olga@mail.ru.

Відомості про автора:

Ганчева О.В., д. мед. н., професор каф. патологічної фізіології, Запорізький державний медичний університет, E-mail: Gancheva_olga@mail.ru.

Information about author:

Gancheva O.V., D.hab., Professor of Pathophysiology Department, Zaporizhzhia State Medical University, E-mail: Gancheva_olga@mail.ru.

Надійшла в редакцію 21.01.2015 р.