

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

Максимович Дарья Игоревна

студент, Белорусский Государственный Университет, Республика Беларусь, г. Минск

Корик Елена Олеговна

канд. биол. наук, доц. кафедры биохимии биологического факультета Белорусского государственного университета, Республика Беларусь, г. Минск

Research of the activity of antioxidant enzymes in rats with experimental metabolic syndrome

Korik Elena Olegovna

scientific director, candidate of biological sciences, associate professor of the biochemistry department of the biological faculty, Belarusian State University, Republic of Belarus, Minsk

Maksimovich Darya Igorevna

Student, Belarusian State University, Republic of Belarus, Minsk

Аннотация. Распространенность метаболического синдрома, который включает в себя кластер сердечно-сосудистых факторов риска, связанных с ожирением и резистентностью к инсулину, последнее время резко возрастает в развивающихся странах. Одним из недостатков при метаболическом синдроме и связанных с ним заболеваний является избыток активных форм кислорода (АФК). Ферменты, катализирующие разложение активных форм кислорода включают супероксиддисмутазу и каталазу. В статье отражены изменения активности данных антиоксидантных ферментов у крыс с экспериментальным метаболическим синдромом.

Abstract. The prevalence of metabolic syndrome, which includes a cluster of cardiovascular risk factors associated with obesity and insulin resistance, has recently increased in developing countries. One of disadvantages of the metabolic syndrome and related diseases is an excess of reactive oxygen species (ROS). Enzymes that catalyze the decomposition of reactive oxygen species include superoxide dismutase and catalase. The article reflects changes in the activity of these antioxidant enzymes in rats with an experimental metabolic syndrome.

Ключевые слова: активность антиоксидантных ферментов, активные формы кислорода, супероксиддисмутазы, каталазы, метаболический синдром, эндогенная интоксикация, окислительный стресс, инсулинорезистентность, абдоминальное ожирение, жировой гепатоз.

Keywords: activity of antioxidant enzymes, active forms of oxygen, superoxide dismutase, catalase, metabolic syndrome, endogenous intoxication, oxidative stress, insulin resistance, abdominal obesity, fatty hepatosis.

Оглядываясь на то время, когда для человечества являлось огромной проблемой добыть пищу для выживания, нет никаких сомнений в том, что индустриализации удалось создать большое разнообразие высококалорийной жирной пищи, которая легко доступна небольшими физическими усилиями. Такого рода питание привело к противоположному эффекту – развитию заболеваний и медицинских проблем, связанных с питанием, таких как ожирение, сахарный диабет второго типа (СД2), а также сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) [1, 8, 10–11, 13, 16–17]. С физиологической точки зрения, этим проблемам со здоровьем часто предшествует кластер патологических нарушений, которые в совокупности называются метаболическим синдромом [3–7, 9, 12, 15].

Метаболический синдром характеризуется гипертриглицеридемией, снижением липопротеинов высокой плотности, повышением липопротеинов низкой плотности, резистентностью к инсулину, нарушением толерантности к глюкозе и гипертонией, а в сочетании с генетической предрасположенностью и абдоминальным ожирением, он является фактором риска для развития сахарного диабета 2 типа, сосудистого воспаления, атеросклероза, патологий почек, печени и сердечно-сосудистых заболеваний.

Одним из недостатков при метаболическом синдроме и связанных с ним заболеваний является избыток активных форм кислорода (АФК). Активные формы кислорода, генерируемые митохондриями, могут привести к повреждению митохондриальных компонентов и инициировать процессы деструкции [2]. В условиях окислительного стресса они вызывают клеточные дисфункции и значительные нарушения метаболизма.

В организме имеется комплексная система антиоксидантной защиты для борьбы с АФК, которая состоит из антиоксидантных ферментов и некоторых неферментных ловушек свободных радикалов. Ферменты, катализирующие разложение активных форм кислорода включают супероксиддисмутазу (СОД) и каталазу [14].

Цель данного исследования: изучение активности данных антиоксидантных ферментов в гемолизате эритроцитов и сыворотке крови крыс с экспериментальным метаболическим синдромом.

Постановка МС. Работа выполнена на крысах линии Вистар, самцах и самках массой 200-250 г. Контрольная серия экспериментальных животных находилась на сбалансированной диете для грызунов. Опытная серия также находилась на сбалансированной диете, однако вместо воды животные получали 25% раствор фруктозы и дополнительно животные жиры (маргарин, сливочное масло) в течении 10-ти недель.

Определение развития МС. До начала эксперимента и непосредственно перед декапитацией была измерена масса животных и рассчитан ее прирост. Отдельно измерялась масса печени. По результатам исследования опытным путём было установлено, что у самок в большей степени развилось абдоминальное ожирение, а у самцов возник жировой гепатоз.

Таблица 1.

Изменение массы животных и массы печени в течение эксперимента

	Масса в начале эксперимента (г)	Масса перед декапитацией (г)	Прирост массы (г)	Масса
Серия 1	181,25±19,4	407±18,2	225,75±7*	12,
Серия 2	229,3±18,6	454,3±37,8	225±44,6*	16,
Серия 3	179±7,7	290,3±25,1	111,3±28*	10,
Серия 4	152,17±10,2	266,8±26	114,7±30,9*	9,

Примечание:

Серия 1 – интактные самцы;

Серия 2 – самцы с экспериментальным метаболическим синдромом;

Серия 3 – интактные самки;

Серия 4 – самки с экспериментальным метаболическим синдромом.

* - рассчитанное значение *t*-критерия Стьюдента меньше критического, следовательно, наблюдаемые различия значений опыта относительно контроля статистически незначимы (уровень значимости $p < 0,05$).

** - рассчитанное значение *t*-критерия Стьюдента больше критического, следовательно, наблюдаемые различия значений опыта относительно контроля статистически значимы (уровень значимости $p > 0,05$).

В качестве субстрата для СОД использовали раствор кверцетина. В качестве источника фермента использовались сыворотка и гемолизат эритроцитов, разведенный в 1000 раз. Активность фермента определялась по степени ингибирования реакции автоокисления кверцетина. Измерения оптической плотности проводились на спектрофотометре Solar PV 1251С при длине волны 406 нм. Единицы измерения – мкмоль/мин*г гемоглобина/белка [19].

В качестве субстрата для каталазы использовали раствор перекиси водорода. В качестве источника фермента использовались сыворотка и гемолизат эритроцитов, разведенные в 200 раз. Реакцию останавливали добавлением 4% молибдата аммония. Интенсивность развивающейся окраски измеряли на спектрофотометре Solar PV 1251С при длине волны 410 нм. Единицы измерения – мкмоль/мин*г гемоглобина/белка [20].

Полученные результаты отражены в таблице 2.

Таблица 2.

Изменение активности антиоксидантных ферментов

№ серии	1	2	3	
Удельная активность СОД, мкмоль/мин*г гемоглобина/белка				
Гемолизат	0,77±0,02	1,57±0,31**	0,94±0,06	
Сыворотка	0,062±0,005	0,053±0,005*	0,049±0,002	
Удельная активность каталазы, мкмоль/мин*г гемоглобина/белка				
Гемолизат	24,85±3,74	41,32±5,81**	26,09±1,28	
Сыворотка	22,19±1,77	17,89±1,37*	13,84±1,14	

Примечание:

Серия 1 – интактные самцы;

Серия 2 – самцы с экспериментальным метаболическим синдромом;

Серия 3 – интактные самки;

Серия 4 – самки с экспериментальным метаболическим синдромом

* - рассчитанное значение *t*-критерия Стьюдента меньше критического, следовательно, наблюдаемые различия значений опыта относительно контроля статистически незначимы (уровень значимости $p < 0,05$)

** - рассчитанное значение *t*-критерия Стьюдента больше критического, следовательно, наблюдаемые различия значений опыта относительно контроля статистически значимы (уровень значимости $p > 0,05$)

Метаболический синдром, вызванный несбалансированным питанием и малоподвижным образом жизни, является мощнейшим индуктором разнообразных клеточных и биохимических аномалий, в том числе окислительных процессов. АФК, окисляя биологические макромолекулы клеток, активизируют развитие деструктивных процессов в тканях. Аккумуляция продуктов углеводного и липидного обмена запускает механизм эндогенной интоксикации, в том числе и свободно-радикальные процессы. Существуют четыре стадии развития эндогенной интоксикации: 1 стадия (лёгкая степень) характеризуется активацией ПОЛ и гиперактивацией антиоксидантной активности каталазы и супероксиддисмутазы; 2-4 стадии эндогенной интоксикации (от средней степени тяжести до крайне тяжёлой) характеризуются гиперактивацией ПОЛ с истощением активности антиоксидантных ферментов [22].

Закономерное увеличение содержания АФК в гемолизате крови крыс с МС сопровождалось увеличением удельной активности СОД и каталазы у самцов на 50,9% и 39,8% соответственно, у самок - 0,12% и 33,27% соответственно по сравнению с контрольной группой. Достоверное значимое повышение активности СОД и каталазы у самцов объясняется большим количеством образовавшихся при окислительном стрессе продуктов свободно-радикальных процессов - супероксиданион-радикала и пероксида водорода. Так как СОД и каталаза являются первым защитным барьером организма от АФК, то корреляция активности этих ферментов с увеличением количества активных форм кислорода является вполне оправданной. Таким образом увеличение активности антиоксидантных ферментов указывает на развитие эндогенной интоксикации лёгкой степени тяжести.

Активация свободно-радикальных реакций в крови компенсировалась антиоксидантной защитой до тех пор, пока не происходила разбалансировка антиоксидантных ферментов вследствие ещё большего увеличения продукции АФК, связанной с увеличением концентрации жирных кислот и транспортом их в печень. Удельная активность СОД в сыворотке крыс с МС снижалась по сравнению с контролем на 14,5% и 28,6% у самцов и самок соответственно, удельная активность каталазы в сыворотке крыс с МС снижалась по сравнению с контролем на 19,4% и 82,23% у самцов и самок соответственно. Достоверное снижение активности СОД и каталазы в сыворотке самок крыс с МС можно объяснить снижением выработки в яичниках женских половых гормонов (эстрогенов), которые являются эндогенной неферментной формой антиоксидантной защиты в организме. В свою очередь снижение концентрации эстрогенов в крови самок сопровождается неконтролируемым повышением уровня АФК [18]. Выявленное нами существенное снижение активности СОД и каталазы у самок крыс с МС можно связать с тем, что данные ферменты сами существенно повреждаются при гиперпродукции АФК. Снижение активности антиоксидантных ферментов в организме является маркером эндогенной интоксикации тяжёлой или крайне тяжёлой степени тяжести.

Подводя итоги, можно заключить, что метаболический синдром характеризуется развитием эндогенной интоксикации, однако у самцов и самок степень её проявления различается. В ходе исследования было выявлено, что у самцов метаболический синдром, вызванный повышенным потреблением жиров, индуцировал развитие жирового гепатоза, основной причиной появления которого следует считать эндогенную интоксикацию активными формами кислорода. Повышение активности антиоксидантных ферментов указывает на лёгкую степень тяжести интоксикации у самцов с экспериментальным метаболическим синдромом.

В отличие от самцов, основным маркером развития метаболического синдрома у самок

явилось абдоминальное ожирение. Как и в случае с самцами, основной причиной его развития явилась эндогенная интоксикация, которая сопровождалась снижением концентрации эстрогенов в крови, и как следствие, неконтролируемым повышением уровня АФК. Это привело к снижению активности антиоксидантных ферментов, что характеризует проявление эндогенной интоксикации тяжёлой или крайне тяжёлой степени тяжести у самок с экспериментальным метаболическим синдромом.

Степень эндогенной интоксикации активными формами кислорода является одним из основных факторов развития метаболического синдрома, что делает эндотоксемию неотемлимой частью патогенеза этого заболевания, а уровень активности антиоксидантных ферментов является главным отражением свободно-радикальных процессов в организме.

Список литературы:

1. Bamba V., Rader D. J. Obesity and atherogenic dyslipidemia. // *Gastroenterology*. – 2007. – №132. – С. 2181–2190. [PubMed]
2. Bonomini F., Rodella L. F., Rezzani R. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress // *Aging Dis.* – 2015. – №6. – С. 109–120. [PubMed].
3. Cai D., Liu T. Inflammatory cause of metabolic syndrome via brain stress and NF- κ B // *Aging (Albany NY)*. – 2012. – №4 (2). – С. 98–115. [PubMed].
4. Despres J.P., Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome // *Nature*. – 2006. – №444. – С. 881–887. [PubMed].
5. Duvnjak L., Duvnjak M. The metabolic syndrome – an ongoing story // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2009. – №60. – С. 19–24. [PubMed].
6. Eckel R. H., Grundy S. M., Zimmet P. Z. The metabolic syndrome // *Lancet*. – 2005. – №365. – С. 1415–1428. [PubMed].
7. Gaddam K. K., Ventura H. O., Lavie C. J. Metabolic syndrome and heart failure—the risk, paradox, and treatment. // *Curr Hypertens Rep.* – 2011. – №13. – С. 142–148. [PubMed].
8. Giovannucci E., Michaud D. The role of obesity and related metabolic disturbances in cancers of the colon, prostate, and pancreas // *Gastroenterology*. – 2007. – №132. – С. 2208–2225. [PubMed].
9. Guarente L. Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome // *Nature*. – 2006. – №444. – С. 868–874. [PubMed].
10. Humphreys M. H. The brain splits obesity and hypertension // *Nat Med*. – 2011. – №17. – С. 782– 783. [PubMed].
11. Kahn S. E., Hull R. L., Utzschneider K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes // *Nature*. – 2006. – №444. –С. 840–846. [PubMed].
12. Moulana M., Lima R., Reckelhoff J. F. Metabolic syndrome, androgens, and hypertension // *Curr Hypertens Rep.* – 2011. – №13. –С. 158–162. [PubMed].
13. Parekh S., Anania F. A. Abnormal lipid and glucose metabolism in obesity: implications for nonalcoholic fatty liver disease. // *Gastroenterology*. – 2007. – №132. – С. 2191–2207. [PubMed].
14. Roberts, C. K. Oxidative stress and metabolic syndrome / C. K. Roberts, K. K. Sindhu // *Life Sci.* – 2009. – Vol. 84, N 21/22. – P. 705–712.
15. Rodriguez A., Muller D. C., Metter E. J., Maggio M., Harman S. M., Blackman M. R. Aging, androgens, and the metabolic syndrome in a longitudinal study of aging // *J Clin Endocrinol Metab.*

- 2007. - №92. - С. 3568-3572. [PubMed].

16. Semenkovich C. F. Insulin resistance and atherosclerosis // J Clin Invest. - 2006. - №116. - С. 1813-1822. [PubMed].

17. Van Gaal L. F., Mertens I. L., De Block C. E. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease // Nature. - 2006. - №444. - С. 875-880. [PubMed].

18. Арушанян, Э. Б. Эстрогенные гормоны и эндотелиальная дисфункция. Сообщение 1. Эстрогены и метаболический синдром / Э. Б. Арушанян // Мед. вестн. Сев. Кавказа. - 2014. - Т. 9, № 4. - С. 386-392.

19. Костюк В.А., Потапович, А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. // Вопросы медицинской химии, 1990. - Т.36. - №2. - С. 88-91.

20. Метод определения активности каталазы / М.А. Королук [и др.] // Лабораторное дело. - 1988. - № 1. - С. 16-19.

21. Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий. - Мн.: Высшая школа, 1973. - 319 с.

22. Экология человека: учебник для вузов / Под ред. Григорьева А.И. - 2008. - 240 С.