

ВЛИЯНИЕ ИНСУЛИНА, СИСТЕМЫ ГЛУТАТИОНА И СУПЕРОКСИДНОГО АНИОН-РАДИКАЛА НА МОДУЛЯЦИЮ ЛИПОЛИЗА В АДИПОЦИТАХ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ДИАБЕТОМ

© 2015 В.В. Иванов, Е.В. Шахристова*, Е.А. Степовая, О.Л. Носарева, Т.С. Федорова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий

*Сибирский государственный медицинский университет
Минздрава России, 634050 Томск, Московский тракт, 2;
факс: +8(3822)53-3309, электронная почта: office@ssmu.tomsk.ru,
shaxristova@yandex.ru*

Поступила в редакцию 14.05.14
После доработки 18.07.14

Установлено, что в адипоцитах крыс с аллоксановым диабетом увеличивается спонтанный липолиз, ингибируется стимулированный изопротеренолом гидролиз триацилглицеролов на фоне окислительного стресса и снижения редокс-статуса клеток. Выявлено снижение способности инсулина ингибировать стимулированный изопротеренолом гидролиз триацилглицеролов в адипоцитах, изолированных из жировой ткани крыс с экспериментальным сахарным диабетом, что свидетельствует о нарушении регуляции гормоном липолиза в жировых клетках при аллоксановом диабете. На основании полученных данных сделан вывод о влиянии активных форм кислорода, в частности супероксидного анион-радикала, и редокс-потенциала системы глутатиона на молекулярные механизмы изменения интенсивности липолиза в адипоцитах крыс в условиях окислительного стресса, индуцированного аллоксаном. Активация спонтанного липолиза в условиях окислительного стресса может являться одной из причин повышенного содержания свободных жирных кислот в плазме крови при экспериментальном диабете, что может играть важную роль в развитии инсулинорезистентности и возникновении осложнений сахарного диабета.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сахарный диабет, адипоциты, окислительный стресс, липолиз, система глутатиона, марганец-тетра (N-метил-4-пиридил) порфирин, N-этилмалеимид.

Развитие различных патологий, в частности сахарного диабета (СД), сопровождается нарушением процессов редокс-регуляции в клетках и формированием окислительного стресса [1]. Активные формы кислорода (АФК) оказывают регулирующее влияние на клетки посредством их участия в качестве вторичных мессенджеров в передаче сигналов, опосредованных лиганд-

рецепторными взаимодействиями, в т.ч. в трансдукции инсулинового сигнала [2]. В то же время нарушение баланса между про- и антиоксидантами, гипергликемия и высокий уровень свободных жирных кислот при СД приводят к повышению уровня АФК, способствующих окислительному повреждению макромолекул (липидов, белков и нуклеиновых кислот), что лежит в основе патогенеза СД и развития осложнений, в т.ч. инсулинорезистентности [3–5]. Согласно современным представлениям важную роль в механизмах формирования инсулинорезистентности при СД играет жировая ткань [6]. В регуляции метаболических процессов в клетках, в т.ч. в адипоцитах, важную роль играет глутатион, который в комплексе с глутатионпероксидазой и глутатионредуктазой образует систему, обладающую антиоксидантной активностью. Эпидидимальная жировая ткань характеризуется высоким содержанием общего глутатиона, но низким редокс-статусом и повышен-

Принятые сокращения: СД – сахарный диабет; АФК – активные формы кислорода; O_2^- – супероксидный анион-радикал; OH^- – гидроксильный анион-радикал; ТБК-активные продукты – продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой; Db-cAMP – аналог cAMP (N(6)-2'-дибутирил-cAMP); Mn-TMPyP – ловушка супероксидного анион-радикала (марганец-тетра(N-метил-4-пиридил)порфирин); NEM – блокатор SH-групп (N-этилмалеимид); GSH + GSSG – общий глутатион; GSH – восстановленный глутатион; GSSG – окисленный глутатион; белок-SSG – белково-связанный глутатион; ГПО – глутатионпероксидаза; ТАГ – триацилглицеролы; ПОЛ – перекисное окисление липидов.

* Адресат для корреспонденции.

ной чувствительностью системы глутатиона к окислительному стрессу [7].

Известно, что диабетогенное действие аллоксана опосредовано продукцией АФК преимущественно в β -клетках островков Лангерганса, обладающих низкой активностью ферментов антиоксидантной защиты. При этом аллоксан, восстанавливаясь в диалуровую кислоту, способствует продукции АФК, в частности супероксидного (O_2^-) и гидроксильного (OH^-) анион-радикалов [8, 9]. Это позволяет использовать аллоксан в качестве прооксиданта для моделирования окислительного стресса в изолированных клетках.

Целью настоящего исследования являлось изучение активности спонтанного и стимулированного липолиза, эффектов инсулина в адипоцитах крыс с аллоксановым диабетом, а также установление роли супероксидного анион-радикала в модуляции липолиза в изолированных адипоцитах крыс при окислительном стрессе, индуцированном аллоксаном.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на 42 крысах-самцах Wistar массой 310 ± 50 г, полученных из вивария НИИ фармакологии имени Е.Д. Гольдберга г. Томска. Животных содержали в стандартных условиях вивария на обычном рационе кормления при свободном доступе к воде и пище. Исследования проводились согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1987 г.) и Федеральному закону «О защите животных от жестокого обращения» от 01.09.1997 г., а также с соблюдением конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, принятой Европейским союзом в 1986 г., и директивы 86/609 ЕЭС.

Методом случайной выборки животные были распределены на группы: контрольную группу (12 крыс), опытную группу (10 крыс) и группу для экспериментов *in vitro* (20 крыс). На первом этапе работы в опытной группе экспериментальный диабет у крыс вызывали четырехкратной инъекцией аллоксана (90 мг/кг), животным контрольной группы с той же частотой и в том же объеме вводили физиологический раствор. Через две недели после введения аллоксана и физиологического раствора животных усыпляли CO_2 -асфиксией, получали эпидидимальную жировую ткань, из которой выделяли адипоциты с использованием коллагеназы («Sigma Aldrich», США) по методу Родбелл [10].

Концентрацию адипоцитов в суспензии довели до 1×10^6 клеток в 1 мл с помощью разведения буфером, содержащим 10 мМ Hepes («Sigma Aldrich», США), раствор Кребса–Рингера [10], 2% (*m/V*) БСА V фракции («ПанЭко», Россия) и 5 мМ глюкозы. Жизнеспособность выделенных клеток оценивали по окрашиванию трипановым синим («Serva», США). Доля живых клеток составляла не менее 95%.

Интенсивность липолиза оценивали по концентрации в среде инкубации адипоцитов глицерола, определяемого ферментативным методом Виланда [11], и свободных жирных кислот, содержание которых регистрировали с помощью набора фирмы «RANDOX» (Великобритания) согласно протоколу производителя.

Для оценки интенсивности стимулированного липолиза и ингибирующего действия на него инсулина содержание глицерола определяли в инкубационной среде после трех часов инкубации адипоцитов в присутствии изопротеренола (агонист β_2 -адренорецепторов, «Sigma», США; 1 мкМ) [12] и инсулина («Sigma», США; 10 нМ) [13].

Об активности перекисного окисления в адипоцитах судили по содержанию гидроперекисей липидов, концентрацию которых регистрировали FOX-2 методом [14], и продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активных продуктов) – флуоресцентным методом Яги с соавт. [15].

Состояние антиоксидантной системы защиты в адипоцитах оценивали по содержанию общего, восстановленного и окисленного глутатиона, определяемого циклическим методом Андерсона [16], а также исследовали концентрацию белково-связанного глутатиона после осаждения белков 5%-ной (*m/V*) сульфосалициловой кислотой. Активность глутатионпероксидазы оценивали по интенсивности окисления NADPH [17].

На втором этапе исследований проводили эксперименты *in vitro* на изолированных адипоцитах из эпидидимальной жировой ткани крыс. Окислительный стресс в адипоцитах индуцировали добавлением 5,0 мМ аллоксана («Sigma», США) [5]. Клетки инкубировали 3 ч при 37° в CO_2 -инкубаторе («Sanyo», Япония). Интенсивность спонтанного липолиза, а также стимулированного изопротеренолом (1 мкМ, «Sigma», США) [12] и аналогом cAMP – N(6)-2'-дибутирил-cAMP (Db-cAMP) (0,5 мМ, «Sigma», США) [18] липолиза оценивали по содержанию глицерола в среде инкубации адипоцитов, определяемого ферментативным методом [11].

Для выявления влияния продуцируемого аллоксаном O_2^- на липолиз в адипоцитах клетки

инкубировали с ловушкой супероксидного анион-радикала – марганец-тетра (N-метил-4-пиридил) порфирином (Mn-TMPyP) («Sigma», США) в конечной концентрации 100 мкМ [19]. Для оценки участия глутатиона в модуляции липолиза в адипоцитах в условиях окислительного стресса, индуцированного аллоксаном, клетки инкубировали с блокатором SH-групп – N-этил-малеимидом (NEM) («Sigma», США) в конечных концентрациях 0,2 и 0,8 mM [20]. После инкубации адипоцитов с NEM в клетках определяли содержание восстановленной и окисленной форм глутатиона циклическим методом Андерсона [16], а также концентрацию белково-связанного глутатиона после осаждения белков 5%-ной (*m/V*) сульфосалициловой кислотой. Оценивали интенсивность спонтанного и стимулированного изопротеренолом липолиза по выходу глицерола в среду инкубации адипоцитов [11].

При анализе полученных данных использовали методы статистического описания и проверки статистических гипотез с использованием программы SPSS 11.0 для Windows. Проверка на соответствие выборок нормальному закону распределения проводилась критерием Шапиро–Уилка. В связи с отсутствием соответствия данных нормальному закону распределения на уровне значимости $p < 0,01$ и $p < 0,05$ вычисляли средневыборочные характеристики: медиана (Me), первый и третий квартили (Q_1 – Q_3). Достоверность различий выборок оценивали с по-

мощью непараметрических критериев Манна–Уитни и Краскала–Уолиса для малых групп. Различия считались достоверными при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$ или $p < 0,01$. Межгрупповой анализ проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе экспериментальных исследований в адипоцитах эпидидимальной жировой ткани крыс с аллоксановым диабетом нами было зарегистрировано увеличение концентрации гидроперекисей липидов в 1,6 раза ($p < 0,01$) (табл. 1). Дегградация первичных метаболитов перекисного окисления липидов (ПОЛ) приводила к накоплению вторичных и конечных продуктов свободнорадикального процесса. Установлено возрастание содержания в 5,9 раза ($p < 0,01$) ТБК-активных продуктов в адипоцитах крыс с экспериментальным диабетом (табл. 1). Повышение содержания гидроперекисей липидов и ТБК-активных продуктов может быть следствием окисления ненасыщенных жирных кислот в липидных каплях адипоцитов крыс с аллоксановым диабетом.

Активация ПОЛ в жировой ткани крыс с аллоксановым диабетом приводила к снижению ($p < 0,01$) концентрации общего глутатиона в 1,2 раза и восстановленной формы трипептида в

Таблица 1. Содержание гидроперекисей липидов, ТБК-активных продуктов, общего, восстановленного, окисленного и белково-связанного глутатиона; активности глутатионпероксидазы в адипоцитах крыс с аллоксановым диабетом, (Me (Q_1 – Q_3), p)

Исследуемые показатели	Контроль (введение физиологического раствора), $n = 12$	Аллоксановый диабет, $n = 10$
Гидроперекиси липидов, нмоль/мг белка	5,64 (5,12–5,86)	8,93 (8,87–9,38) $p < 0,01$
ТБК-активные продукты, нмоль/мг белка	0,98 (0,92–1,05)	5,76 (4,70–5,93) $p < 0,01$
GSH + GSSG, нмоль/мг белка	19,61 (19,02–19,86)	15,75 (14,68–15,89) $p < 0,01$
GSH, нмоль/мг белка	17,01 (16,42–17,33)	13,28 (12,10–13,66) $p < 0,01$
GSSG, нмоль/мг белка	2,43 (2,31–2,53)	2,55 (2,54–2,71)
GSH/GSSG	7,30 (6,90–7,60)	5,20 (4,75–5,30) $p < 0,01$
Белок-SSG, нмоль/мг белка	1,68 (1,45–1,93)	2,22 (2,05–2,42) $p < 0,05$
ГПО, нмоль NADPH/(мин · мг белка)	241,1 (219,6–284,1)	131,8 (85,7–187,6) $p < 0,01$

Примечание. p – Уровень значимости различий, рассчитанный относительно контрольных величин; GSH + GSSG – общий глутатион; GSH – восстановленный глутатион; GSSG – окисленный глутатион; белок-SSG – белково-связанный глутатион; ГПО – глутатионпероксидаза.

1,3 раза. В наших исследованиях увеличение содержания окисленного глутатиона не наблюдалось (табл. 1). В адипоцитах крыс с аллоксановым диабетом возрастала концентрация белково-связанного глутатиона в 1,3 раза ($p < 0,05$) (табл. 1). Можно предполагать, что образующаяся окисленная форма глутатиона не накапливается, а взаимодействует с SH-группами белков.

У крыс с аллоксановым диабетом снижалась в 1,8 раза ($p < 0,01$) активность глутатионпероксидазы (ГПО, КФ 1.11.1.9) (табл. 1), использующей восстановительный потенциал глутатиона, что может быть связано с уменьшением содержания GSH при чрезмерной продукции АФК при экспериментальном диабете.

Таким образом, развитие аллоксанового диабета у крыс сопровождалось окислительным стрессом, характеризующимся увеличением содержания в адипоцитах продуктов липидной пероксидации и снижением антиоксидантного потенциала системы глутатиона.

В условиях активации окислительного стресса в адипоцитах крыс с аллоксановым диабетом увеличивается спонтанный липолиз, о чем свидетельствует накопление свободных жирных кислот и глицерола в среде инкубации жировых клеток. Так, концентрация свободных жирных кислот в среде инкубации адипоцитов крыс с аллоксановым диабетом увеличивалась в 2,8 раза ($p < 0,01$) по сравнению с аналогичным показателем в среде инкубации жировых клеток крыс контрольной группы, составившим 0,12 (0,08–0,17) мкмоль/ 10^6 клеток. Выход глицерола в среду при инкубации изолированных адипоцитов, полученных от животных с аллоксановым диабетом, составил 0,48 (0,45–0,50) мкмоль/ 10^6 клеток, что в 1,6 раза ($p < 0,01$) выше такового в клетках, изолированных из эпидидимальной жировой ткани животных контрольной группы.

Известно, что свободные жирные кислоты, образовавшиеся в адипоцитах в процессе липолиза, подвергаются частичной реэтерификации и используются для синтеза молекул триацилглицеролов (ТАГ) в жировых клетках [21]. В то же время глицерол из-за низкой активности глицеролкиназы (КФ 2.7.1.30) адипоцитов в этих процессах не используется, и измерение его концентрации в инкубационной среде более адекватно отражает интенсивность липолиза. Поэтому в дальнейших исследованиях *in vitro* оценка интенсивности липолиза в адипоцитах осуществлялась по выходу глицерола в среду инкубации.

Липолиз регулируется гормонами, такими как адреналин, глюкагон, инсулин, а также адипокинами, продуцируемыми жировыми клетками [22–24]. Нами была исследована интенсив-

ность стимулированного агонистом β_2 -адренорецепторов изопротеренолом липолиза в изолированных адипоцитах крыс с аллоксановым диабетом в сравнении с жировыми клетками животных контрольной группы.

Изопротеренол в концентрации 1 мкМ усиливает в 3,6 раза ($p < 0,01$) липолиз в адипоцитах крыс контрольной группы по сравнению со спонтанным уровнем (табл. 2). Введение агониста β_2 -адренорецепторов в среду инкубации адипоцитов, полученных от животных с аллоксановым диабетом, увеличивало выход глицерола в среду в 1,9 раза ($p < 0,01$) (табл. 2).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что изопротеренол в меньшей степени стимулирует липолиз в адипоцитах, изолированных из эпидидимальной жировой ткани животных с аллоксановым диабетом, чем в жировых клетках крыс контрольной группы. Активация окислительного стресса в жировой ткани крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом приводит к изменению регуляции липидного обмена в адипоцитах и может явиться одной из причин снижения ответа на стимуляцию агонистом β_2 -адренорецепторов липолиза.

Известно, что инсулин *in vitro* (10 нМ) ингибирует стимулированный липолитическими гормонами гидролиз ТАГ в адипоцитах [13]. Добавление в среду инкубации адипоцитов инсулина не влияло на интенсивность спонтанного липолиза в интактных адипоцитах и клетках, изолированных из жировой ткани животных с аллоксановым диабетом (табл. 2). Это свидетельствует о том, что увеличение выхода глицерола из адипоцитов животных с экспериментальным диабетом обусловлено активацией именно спонтанного липолиза.

Нами было установлено, что в адипоцитах, изолированных из жировой ткани крыс с аллоксановым диабетом, снижается способность инсулина ингибировать стимулированный изопротеренолом липолиз (табл. 2). Это позволяет говорить о нарушении регуляции инсулином мобилизации ТАГ в жировых клетках при экспериментальном аллоксановом диабете.

Для доказательства участия АФК в модулировании липолиза аллоксаном адипоциты предварительно инкубировали с проникающим в клетки миметиком супероксиддисмутазы – Mn-TMPyP. В исследованиях, проведенных нами ранее, было установлено, что значения показателей прооксидантной и антиоксидантной систем в опытах *in vitro* при действии аллоксана на адипоциты в концентрации 5,0 мМ соответствуют таковым в экспериментах *in vivo* на крысах [5]. Поэтому для проведения исследований,

Таблица 2. Влияние инсулина и изопротеренола на содержание глицерола в среде инкубации изолированных адипоцитов крыс с аллоксановым диабетом, (Ме (Q1–Q3), *p*)

Группы исследования			Глицерол, мкмоль/10 ⁶ клеток
Без добавок	контроль, <i>n</i> = 12	1	0,35 (0,32–0,37)
	аллоксановый диабет, <i>n</i> = 10	2	0,45 (0,43–0,47) <i>p</i> ₂₋₁ < 0,05
Инсулин (10 нМ)	контроль, <i>n</i> = 12	3	0,36 (0,35–0,38)
	аллоксановый диабет, <i>n</i> = 10	4	0,48 (0,47–0,50) <i>p</i> ₄₋₃ < 0,05
Изопротеренол (1 мкМ)	контроль, <i>n</i> = 12	5	1,27 (1,15–1,36) <i>p</i> ₅₋₁ < 0,01
	аллоксановый диабет, <i>n</i> = 10	6	0,86 (0,84–0,89) <i>p</i> ₆₋₅ < 0,05, <i>p</i> ₆₋₂ < 0,01
Инсулин (10 нМ) и изопротеренол (1 мкМ)	контроль, <i>n</i> = 12	7	0,93 (0,90–0,96) <i>p</i> ₇₋₅ < 0,05
	аллоксановый диабет, <i>n</i> = 10	8	0,75 (0,72–0,78) <i>p</i> ₈₋₇ < 0,05, <i>p</i> ₈₋₆ < 0,05

Примечание. Контроль – введение физиологического раствора; *p*₂₋₁, *p*₄₋₃, *p*₆₋₅, *p*₈₋₇ – уровень значимости различий, рассчитанный относительно контрольных величин в соответствующих группах исследования; *p*₅₋₁ – уровень значимости различий по сравнению с контрольными адипоцитами (без добавок); *p*₆₋₂ – уровень значимости различий по сравнению с адипоцитами крыс с аллоксановым диабетом (без добавок); *p*₇₋₅ – уровень значимости различий по сравнению с контрольными адипоцитами, инкубированными с 1 мкМ изопротеренола; *p*₈₋₆ – уровень значимости различий по сравнению с адипоцитами крыс с аллоксановым диабетом, инкубированными с 1 мкМ изопротеренола.

направленных на идентификацию молекулярных механизмов изменения активности спонтанного и стимулированного липолиза в адипоцитах, мы использовали концентрацию аллоксана 5,0 мМ как наиболее адекватную для воспроизведения окислительного стресса *in vitro*, сравнимого с опытами *in vivo*.

Нами было установлено, что Mn-TMPyP существенно не влиял на спонтанный липолиз в адипоцитах, но полностью предотвращал его активацию под действием аллоксана (рис. 1). Также было обнаружено, что наряду с активацией спонтанного гидролиза ТАГ аллоксан *in vitro* ингибирует стимулированный изопротеренолом липолиз (рис. 1).

Генерация O₂⁻ под действием аллоксана играет важную роль и в ингибировании диабетогеном стимулированного изопротеренолом липолиза. Mn-TMPyP достоверно повышает сниженный под действием аллоксана стимулированный β-агонистом гидролиз ТАГ. Эти данные свидетельствуют о том, что в механизмах ингибирующего эффекта аллоксана на стимулированный липолиз важную роль играет O₂⁻.

Для уточнения механизма ингибирующего эффекта аллоксана на стимулированный β-агонистом липолиз нами было исследовано влияние Mn-TMPyP на гидролиз ТАГ, стимулированный проникающим в клетку аналогом cAMP Db-cAMP, не гидролизуемым внутриклеточными эстеразами. Инкубация адипоцитов с Db-cAMP приводила к стимуляции липолиза (рис. 1). Ал-

локсан снижал активированный при действии Db-cAMP гидролиз ТАГ в адипоцитах (рис. 1). Ловушка O₂⁻ Mn-TMPyP полностью предотвращала ингибирование аллоксаном стимулированного Db-cAMP липолиза в адипоцитах (рис. 1).

Таким образом, ловушка O₂⁻ Mn-TMPyP предотвращает вызванную аллоксаном активацию спонтанного гидролиза ТАГ и частично снимает ингибирующее действие диабетогена на стимулированный изопротеренолом липолиз и полностью – на Db-cAMP индуцированный липолиз.

Мы предположили, что ингибирование стимулированного липолиза в адипоцитах обусловлено изменением тиолдисульфидного обмена в жировых клетках, поэтому в следующей серии экспериментов нами было исследовано влияние блокатора SH-групп NEM на гидролиз ТАГ и тиолдисульфидную систему адипоцитов.

В результате экспериментов было установлено, что блокирование функциональных SH-групп глутатиона в адипоцитах приводило к увеличению концентрации GSSG, снижению содержания общего глутатиона и GSH (рис. 2). Отмечалась тенденция к увеличению концентрации белково-связанного глутатиона в адипоцитах при блокировании функциональных SH-групп белков (рис. 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что при окислительном стрессе, вызванном блокатором SH-групп NEM, часть GSH может расходоваться для защиты SH-групп белковых молекул путем обратимого

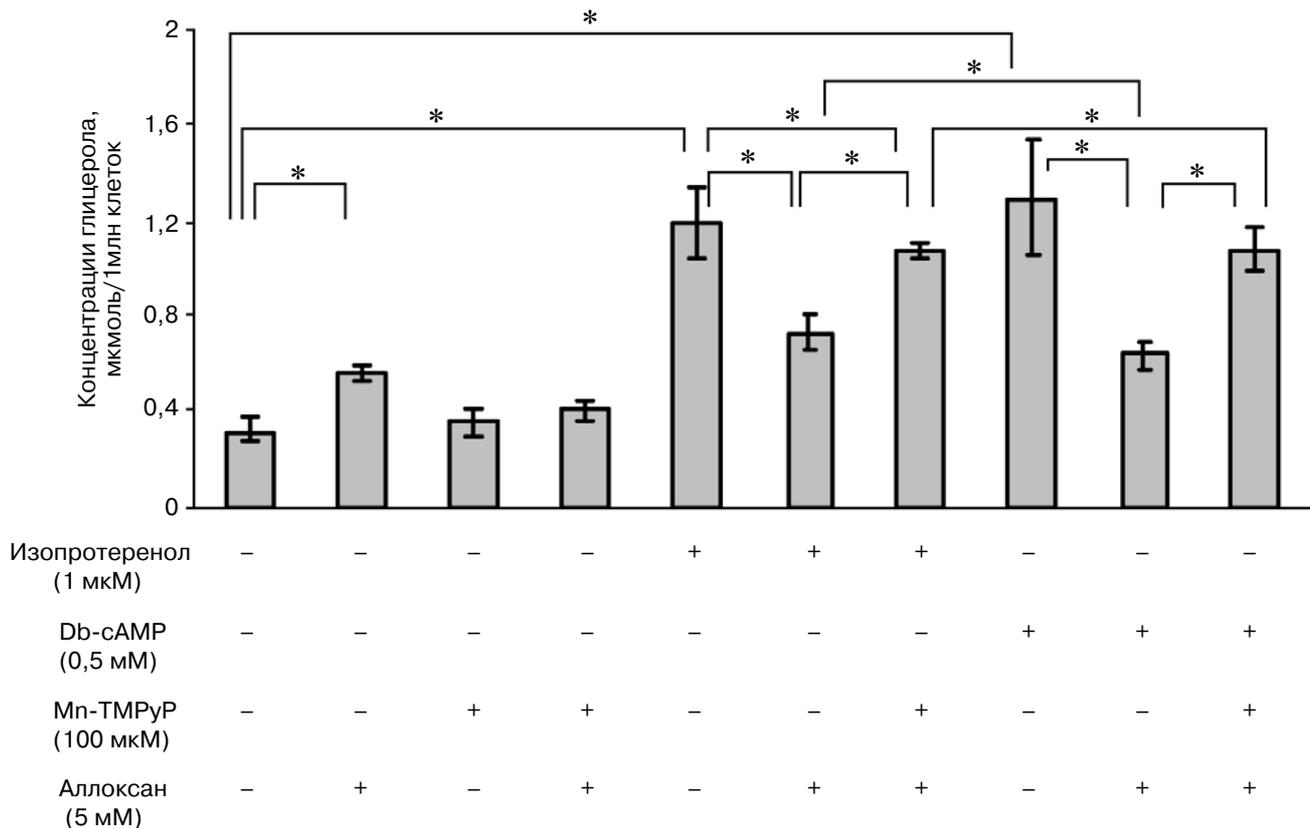


Рис. 1. Влияние стимулятора β_2 -адренорецепторов изопротеренола, аналога сAMP – N(6)-2'-дибутирил-сAMP (Db-cAMP), ловушки супероксидного анион-радикала – марганец-тетра(N-метил-4-пиридил)порфирина(Mn-TMPyP) и аллоксана на липолиз в адипоцитах интактных крыс. * $p < 0,01$ – уровень значимости различий по сравнению с адипоцитами соответствующей группы

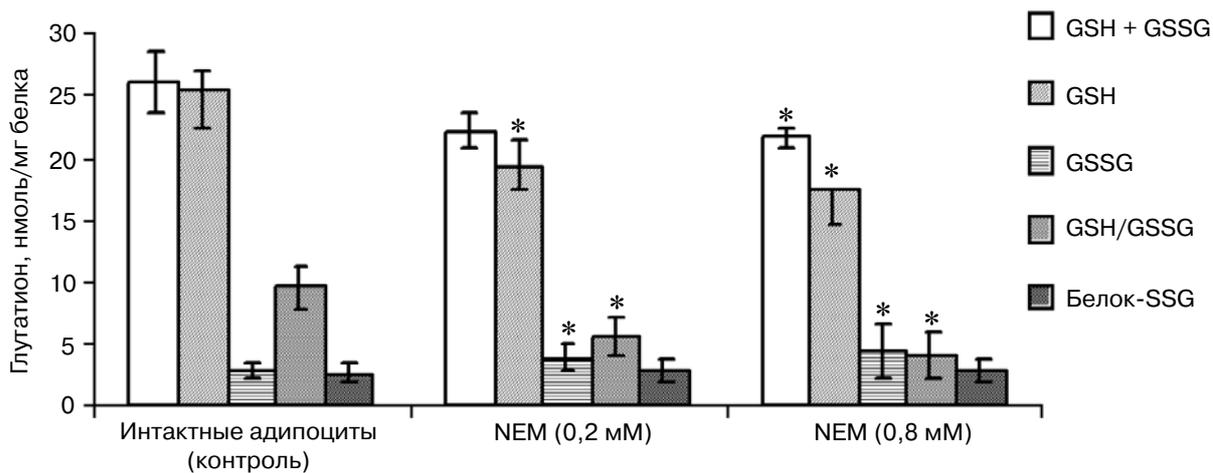


Рис. 2. Параметры системы глутатиона адипоцитов при добавлении блокатора SH-групп N-этилmaleимида в концентрации 0,2 и 0,8 мМ. * $p < 0,05$ – уровень значимости различий по сравнению с интактными адипоцитами; NEM – N-этилmaleимид, GSH + GSSG – общий глутатион; GSH – восстановленный глутатион; GSSG – окисленный глутатион; белок-SSG – белково-связанный глутатион

связывания с ними. Однако это способствует уменьшению восстановительного потенциала системы глутатиона. Так, в адипоцитах отношение восстановленной формы трипептида к окисленной снижалось с увеличением концентрации NEM в среде инкубации клеток (рис. 2).

Таким образом, с возрастанием концентрации NEM в среде инкубации клеток происходит увеличение содержания GSSG и белково-связанного глутатиона, а также снижение концентрации GSH и величины отношения GSH/GSSG в адипоцитах.

Инкубация адипоцитов с 0,2 мМ NEM сопровождалась увеличением концентрации глицерола в среде инкубации клеток в 1,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными значениями (рис. 3). Возрастание концентрации блокатора SH-групп NEM до 0,8 мМ приводило к противоположному эффекту – концентрация глицерола в инкубационной среде снижалась в 1,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными значениями (рис. 3). Это может быть следствием токсического влияния высоких концентраций NEM на адипоциты.

Инкубация адипоцитов с 0,2 мМ NEM и 1 мкМ изопротеренола способствовала снижению содержания глицерола в среде инкубации клеток в 1,3 раза ($p < 0,01$) по сравнению с ана-

логичным показателем в адипоцитах, инкубированных с 1 мкМ изопротеренола без NEM (рис. 3).

Действие 0,8 мМ NEM на стимулированный изопротеренолом (1 мкМ) липолиз еще в большей степени (в 6,7 раза, $p < 0,01$) вызывало снижение концентрации глицерола в среде инкубации адипоцитов по сравнению с аналогичным показателем в адипоцитах, инкубированных с 1 мкМ изопротеренола без NEM (рис. 3).

Таким образом, блокатор SH-групп NEM в адипоцитах, так же как и аллоксан, способствует активации спонтанного и ингибированию стимулированного изопротеренолом липолиза. Это свидетельствует об участии АФК и системы глутатиона в регуляции липолиза в адипоцитах при окислительном стрессе.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В своих исследованиях мы установили, что в жировой ткани крыс с аллоксановым диабетом активируются процессы свободнорадикального окисления, сопровождающиеся накоплением в адипоцитах продуктов ПОЛ и снижением концентрации общего и восстановленного глутатиона. Известно, что начальной стадией ответа

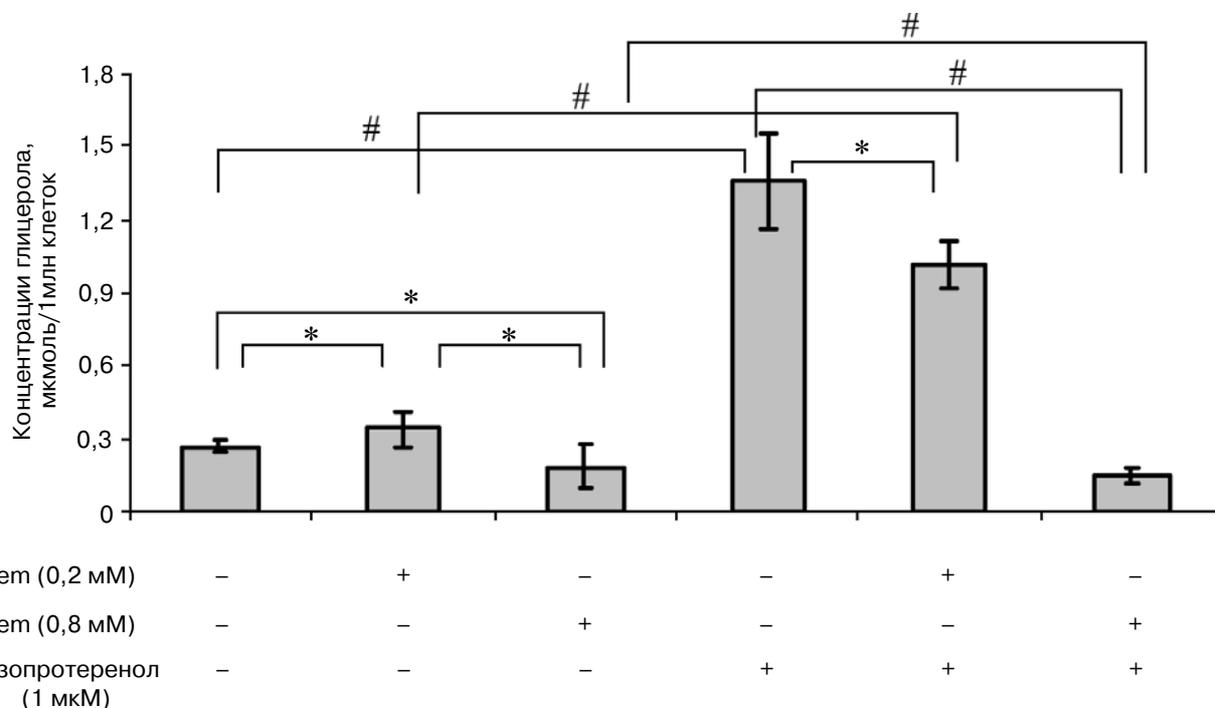


Рис. 3. Влияние агониста β_2 -адренорецепторов изопротеренола и блокатора SH-групп N-этилмалеимида (NEM) на липолиз в адипоцитах. * $p < 0,05$, # $p < 0,01$ – уровни значимости различий по сравнению с адипоцитами соответствующей группы

клеток на окислительный стресс является снижение уровня GSH – главного низкомолекулярного антиоксиданта клеток – и, соответственно, повышение содержания GSSG [25]. Наиболее показательной с точки зрения антиоксидантного потенциала глутатиона является величина отношения восстановленной формы трипептида к окисленной, которое в настоящее время рассматривается как один из маркеров окислительного стресса [4]. Обнаруженное нами снижение величины отношения восстановленного глутатиона к окисленному свидетельствует о сокращении емкости редокс-потенциала глутатион-зависимой системы в адипоцитах крыс с аллоксановым диабетом (табл. 1).

При снижении величины отношения GSH/GSSG в условиях окислительного стресса тиоловые группы белков могут модифицироваться обратимо с образованием смешанных дисульфидов между белковыми SH-группами и SH-группами молекул с низкой молекулярной массой, такими как глутатион, и этот процесс называется S-глутатионирование [26]. При активации ПОЛ образующиеся гидроперекиси липидов, окисляя SH-группы мембранных белков, вносят свой вклад в инактивацию мембрано-ассоциированных ферментов. Свободные радикалы липидов в результате неферментативной реакции с SH-группами белков и пептидов образуют сульфгидрильные радикалы, которые затем взаимодействуют с образованием дисульфидов либо окисляются кислородом с образованием производных сульфоновой кислоты. Возрастание концентрации белково-связанного глутатиона в адипоцитах крыс с аллоксановым диабетом дает возможность предполагать, что расходование GSH в окислительных реакциях сопровождается генерацией окисленной формы трипептида, взаимодействующей с SH-группами белков.

Активация процессов свободнорадикального окисления в жировой ткани приводила к запуску механизмов антиоксидантной защиты адипоцитов. Основной антиоксидантный фонд мобильных сульфгидрильных групп клетки представляет собой GSH, который является также кофактором ГПО и других антиоксидантных ферментов [4, 27]. Снижение активности ГПО при аллоксановом диабете может быть обусловлено низкой экспрессией генов ферментов, участвующих в метаболизме глутатиона – ГПО, глутатионредуктазы (КФ 1.8.1.7) и глутатион-S-трансферазы (КФ 2.5.1.18) [28]. Ингибирование ГПО, возможно, является следствием высокой чувствительности энзима к повышенным концентрациям гидроперекисей липидов, пероксида водорода и может быть одной из причин сни-

жения количества GSH, который расходуется в глутатионпероксидазной реакции.

Известно, что липолиз в жировых клетках характеризуется гормончувствительной и гормоннечувствительной активностью. Гидролиз триацилглицеролов, протекающий без участия гормонального сигнала, получил название спонтанного липолиза [13]. В наших экспериментах установлено, что активация окислительного стресса в жировой ткани крыс при аллоксановом диабете, сопровождающаяся нарушением тиолдисульфидного обмена, способствует стимуляции спонтанного липолиза в изолированных адипоцитах, что приводит к выделению большого количества свободных жирных кислот, которые транспортируются преимущественно в печень и обуславливают развитие инсулинорезистентности на уровне печени [29]. Инсулин, не связавшийся с гепатоцитами, способствует формированию системной гиперинсулинемии. При нарушенной ауторегуляции инсулиновых рецепторов гиперинсулинемия усиливает инсулинорезистентность периферических органов. Свободные жирные кислоты также подавляют тормозящее действие инсулина на глюконеогенез, приводя к увеличению продукции глюкозы печенью. Попадая в системный кровоток, жирные кислоты нарушают поглощение глюкозы и ее утилизацию в мышечной ткани, что способствует усилению периферической инсулинорезистентности [29]. Наряду с этим высокие концентрации глюкозы и свободных жирных кислот нарушают секрецию инсулина, воздействуя на важнейшие этапы синтеза и секреции гормона, начиная от экспрессии гена инсулина и заканчивая поступлением гормона в кровь [30]. Глюкозотоксичность и липотоксичность проявляются угнетением процессов трансляции молекулы инсулина, подавлением экспрессии гена глюкокиназы, снижением митохондриальной функции и наработки АТФ, нарушением механизмов экзоцитоза гормона и усилением апоптоза β -клеток [31–33].

В своих исследованиях мы обнаружили, что агонист β_2 -адренорецепторов изопротеренол в меньшей степени стимулирует липолиз в адипоцитах, изолированных из эпидидимальной жировой ткани крыс с аллоксановым диабетом (табл. 2). Таким образом, активация окислительного стресса в адипоцитах крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом приводит к стимуляции спонтанного липолиза и ингибированию стимулированного агонистом β_2 -адренорецепторов липолиза.

Механизмы регуляции липолиза в жировых клетках в настоящее время интенсивно изучаются. Гормончувствительная липаза (КФ 3.1.1.3)

и перилипин – основные факторы в адипоцитах, которые регулируют липолиз. В нестимулируемых эффекторами клетках гормончувствительная липаза диффузно распределена в цитозоле, в то время как перилипин покрывает поверхность липидных капель. Это препятствует гидролизу молекул ТАГ гормончувствительной липазой. При стимуляции гормонами повышается концентрация внутриклеточного сАМР и активируется протеинкиназа А (КФ 2.7.11.1), которая фосфорилирует гормончувствительную липазу и облегчает ее транслокацию на поверхности жировых капель [13, 34]. Одновременно протеинкиназа А фосфорилирует перилипин, что изменяет поверхностную структуру жировых капель и облегчает связывание гормончувствительной липазы [34].

В исследованиях Теуита с соавт. [35] было показано, что активность гормончувствительной липазы проявляется даже в отсутствие липолитических гормонов, при этом ее действие ограничивается фосфатидилхолином на поверхности эндогенных липидных капель в адипоцитах. Можно предполагать, что активация ПОЛ приводит к дезинтеграции фосфолипидного монослоя на поверхности жировой капли. Это повышает доступность ТАГ для действия липазы и вызывает активацию спонтанного липолиза.

Повышение содержания АФК приводит к активации спонтанного липолиза и, по-видимому, является одним из факторов нарушения способности инсулина блокировать стимулированный гидролиз ТАГ. Действительно, АФК участвуют в положительном и отрицательном регулировании действия инсулина. Они, с одной стороны, облегчают трансдукцию инсулинового сигнала, а с другой – участвуют в механизмах развития инсулинорезистентности [23].

Одним из механизмов ингибирующего действия окислительного стресса на активированный изопротеренолом липолиз может быть изменение концентрации сАМР в ответ на стимуляцию агонистом. Снижение содержания сАМР, возможно, связано с уменьшением образования АТР в условиях окислительного стресса. Наряду с этим АТР служит источником энергии, необходимой для перемещения гормончувствительной липазы на поверхности жировой капли адипоцита [34], что может быть еще одной причиной ингибирования стимулированного липолиза на этапах трансдукции гормонального сигнала после аденилатциклазы. Роль АФК не исчерпывается влиянием на синтез АТР в митохондриях. В частности, пероксид водорода может непосредственно ингибировать стимулированный агонистами липолиз [36]. Высокие концентрации глюкозы также активируют спон-

танный и ингибируют стимулированный липолиз. Грин с соавт. [37] предполагают, что гипергликемия повышает в адипоцитах продукцию фактора некроза опухоли и других провоспалительных цитокинов, которые стимулируют в них липолиз.

Помимо митохондрий источником наработки АФК в адипоцитах при увеличении содержания свободных жирных кислот является активация ими мембрано-связанной NADPH-оксидазы, генерирующей O_2^- . Было показано, что окислительный стресс в жировой ткани при СД сопровождается ее инфльтрацией макрофагами, которые также могут быть источником АФК [38].

Таким образом, данные механизмы могут способствовать развитию окислительного стресса и ингибированию стимулированного липолиза в жировой ткани животных при аллоксановом диабете.

Для подтверждения участия АФК в модулировании липолиза аллоксаном адипоциты инкубировали с проникающим в клетки миметиком супероксиддисмутазы Mn-TMPyP (100 мкМ). Нами было установлено, что Mn-TMPyP не влиял существенно на спонтанный липолиз в адипоцитах, но полностью предотвращал его активацию под влиянием аллоксана (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о важной роли O_2^- , образующегося при восстановлении аллоксана в диалуровую кислоту, и стимулирующем эффекте диабетогена на спонтанный липолиз в адипоцитах. Генерация O_2^- и высвобождение ионов железа из ферритина под действием аллоксана способствуют образованию OH^- в реакции Фентона, активации ПОЛ и окислительной модификации фосфолипидов, покрывающих жировую каплю в адипоцитах [39].

Нами было обнаружено, что наряду с активацией спонтанного липолиза аллоксан *in vitro* ингибирует стимулированный изопротеренолом (1 мкМ) гидролиз ТАГ (рис. 1). Эффект ингибирования стимулированного β -агонистом липолиза в изолированных адипоцитах при добавлении аллоксана *in vitro* согласуется с полученными данными о снижении интенсивности стимулированного липолиза в адипоцитах крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом (табл. 2). Увеличение стимулированного гидролиза ТАГ при действии ловушки O_2^- – Mn-TMPyP (100 мкМ), уровень которого был снижен в присутствии аллоксана, – свидетельствует о том, что в механизмах ингибирующего эффекта аллоксана на индуцируемый изопротеренолом липолиз важную роль играет O_2^- . В то же время уровень глицерола в среде инкубации оставался ниже, чем в экспериментах с адипоци-

тами, инкубированными без аллоксана (рис. 1). Это может быть обусловлено тем, что в реакции восстановления аллоксана в адипоцитах наряду с продукцией АФК образуются радикалы диабегена [8, 9], которые не инактивируются ловушкой O_2^- Mn-TMPyP и могут повреждать липиды и белки, участвующие в трансдукции гормонального сигнала.

Дальнейшее исследование механизмов ингибирующего эффекта аллоксана на стимулированный липолиз при участии аналога cAMP — Db-cAMP и ловушки O_2^- показало, что Mn-TMPyP способен частично снимать ингибирующее действие аллоксана на стимулированный изопротеренолом липолиз и полностью — на Db-cAMP индуцированный липолиз. Эти данные позволяют предполагать, что в механизме ингибирующего эффекта аллоксана на стимулированный гидролиз ТАГ важную роль играет генерируемый в ходе превращения аллоксана в диалуровую кислоту O_2^- . Тот факт, что ингибирующее действие аллоксана на стимулированный липолиз предотвращается ловушкой O_2^- Mn-TMPyP при стимуляции как изопротеренолом, так и Db-cAMP, позволяет предполагать, что мишенью для O_2^- является главным образом не аденилатциклаза, а другие компоненты аденилатциклазного пути трансдукции гормонального сигнала. Так, показано, что протеинкиназа А чувствительна к микромолярным концентрациям пероксида водорода, в т.ч. образующимся в адипоцитах под действием супероксиддисмутазы из O_2^- , генерируемого при активации NADPH-оксидазы инсулином [40]. Пероксид водорода окисляет SH-группы цистеина в составе каталитических и регуляторных субъединиц протеинкиназы А, что препятствует взаимодействию этого фермента с cAMP и ее дальнейшей активации.

Известно, что при развитии свободнорадикального окисления, сопровождающего СД, в клетках окислительным изменениям подвергаются в первую очередь редокс-чувствительные элементы, особенно функциональные SH-группы белков и пептидов. Изменение тиолдисульфидного обмена в адипоцитах может приводить к ингибированию стимулированного липолиза, поэтому в следующей серии экспериментов нами было исследовано влияние блокатора SH-групп NEM на липолиз и систему глутатиона адипоцитов.

NEM способен проникать в клетку и связывать свободные SH-группы пептидов и белков, причем при взаимодействии с глутатионом он образует стабильные комплексы глутатион—NEM без перевода GSH в окисленное дисульфидное состояние [41]. SH-группы, связанные с NEM, теряют способность взаимодействовать с АФК и

препятствовать развитию окислительного стресса. Известно, что GSH расходуется в ходе ряда окислительно-восстановительных реакций как поставщик SH-групп, защищающих макромолекулы клетки от OH^- и других АФК. SH-группа глутатиона окисляется гораздо легче, чем SH-группы в белковых молекулах, и за счет этого реализуется защита макромолекул от необратимой окислительной модификации [27, 42]. Можно предполагать, что при окислительном стрессе в адипоцитах, вызванном блокатором SH-групп NEM, часть GSH может расходоваться для защиты SH-групп белковых молекул путем обратимого связывания с ними. Однако это способствует уменьшению восстановительного потенциала системы глутатиона. Подтверждением этого предположения является обнаруженное нами в адипоцитах достоверное снижение величины отношения GSH/GSSG с увеличением концентрации NEM в среде инкубации клеток (рис. 2).

В условиях сниженного восстановительного потенциала системы глутатиона в адипоцитах возрастает интенсивность спонтанного липолиза и ингибируется стимулированный изопротеренолом (1 мкМ) липолиз (рис. 3). Таким образом, блокатор SH-групп NEM в адипоцитах, так же как и аллоксан, способствует активации спонтанного и ингибированию стимулированного изопротеренолом гидролиза ТАГ. Это свидетельствует об участии АФК и системы глутатиона в регуляции липолиза в адипоцитах при аллоксановом диабете, сопровождающемся окислительным стрессом.

Снижение антиоксидантного потенциала и активация свободнорадикального окисления приводят к повышенной окислительной модификации липидов и белков в адипоцитах. Возникающая при активации ПОЛ дезинтеграция фосфолипидного монослоя на поверхности жировой капли в условиях окислительного стресса в адипоцитах повышает доступность триацилглицеролов действию липаз и активирует спонтанный липолиз. Увеличение активности спонтанного липолиза в условиях окислительного стресса, вызванного аллоксаном, может являться одной из причин повышенного содержания свободных жирных кислот в плазме крови при экспериментальном диабете, что может играть важную роль в развитии инсулинорезистентности и возникновении осложнений СД.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ (соглашение НШ-4184.2014.7).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Brownlee, M. (2005) The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism, *Diabetes*, **54**, 1615–1625.
- Newsholme, P., Haber, E.P., Hirabara, S.M., Rebelato, E.L., Procopio, J., Morgan, D., Oliveira-Emilio, H.C., Carpinelli, A.R., and Curi, R. (2007) Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity, *J. Physiol.*, **1**, 9–24.
- Дубинина Е.Е. (2006) *Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты*, Медицинская пресса, Санкт-Петербург.
- Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. (2008) *Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания*, АРТА, Новосибирск.
- Иванов В.В., Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Жаворонок Т.В., Новицкий В.В. (2011) Влияние аллоксана на спонтанный липолиз и систему глутатиона в изолированных адипоцитах крыс, *Бюлл. эксп. биол. и мед.*, **3**, 288–291.
- Eriksson, J.W. (2007) Metabolic stress in insulin's target cells leads to ROS accumulation – a hypothetical common pathway causing insulin resistance, *FEBS Lett.*, **19**, 3734–3742.
- Galiniere, A., Carriere, A., Fernandez, Y., Carpenne, C., Andre, M., Caspar-Bauguil, S., Thouvenot, J.P., Periquet, V., Penicaud, L., and Casteilla, L. (2006) Adipose tissue pro-adipogenic redox changes in obesity, *Biol. Chem.*, **281**, 12682–12687.
- Szkudelski, T. (2001) The mechanism of alloxan end streptozotocin action in B cells of the rat pancreas, *Physiol Res.*, **50**, 536–546.
- Elsner, M., Gurgul-Convey, E., and Lenzen, S. (2006) Relative importance of cellular uptake and reactive oxygen species for the toxicity of alloxan and dialuric acid to insulin-producing cells, *Free Radic. Biol. Med.*, **5**, 825–834.
- Rodbell, M. (1964) Metabolism of isolated fat cells, *Biol. Chem.*, **239**, 375–380.
- Wieland, O.N. (1984) Glycerol, in *The methods of enzymatic analysis*, Verlag Chemie, Germany, pp. 504–510.
- Lei, T., Xie, W., Han, J., Corkey, B.E., Hamilton, J.A., and Guo, W. (2004) Medium-chain fatty acids attenuate agonist-stimulated lipolysis, mimicking the effects of starvation, *Obes. Res.*, **12**, 599–611.
- Morimoto, C., Kiyama, A., and Kameda, K. (1998) Mechanism of the stimulatory action of okadaic acid on lipolysis in rat fat cells, *J. Lipid Res.*, **41**, 199–204.
- Hermes-Lima, M., Willmore, W.G., and Storey, K.B. (1995) Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylene orange complex formation, *Free Radic. Biol. Med.*, **19**, 271–280.
- Yagi, Y., Matsuda, M., and Yagi, K. (1976) Formation of lipoperoxide in isolated sciatic nerve by chinoxaline-ferric chelate, *Experientia*, **32**, 905–906.
- Anderson, M.E. (1985) Determination of glutathione and glutathione sulfide in biological samples, *Methods Enzymol.*, **113**, 548–555.
- Little, C., and O'Brien, P.J. (1968) An intracellular GSH-peroxidase with a lipid peroxide substrate, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 145–150.
- Kraemer, F.B., and Shen, W.J. (2002) Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis, *J. Lipid Res.*, **43**, 1585–1594.
- Buckley, B.J., and Whorton, A.R. (2000) Adaptive responses to peroxynitrite: increased glutathione levels and cystine uptake in vascular cells, *Cell Physiol.*, **279**, 1168–1176.
- Giudicelli, Y., Provins, D., and Nordmann, R. (1975) Effects of sulfhydryl inhibition on the regulation of basal lipolysis and glucose up take in human adipose tissue, *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 1029–1033.
- Reidy, S.P., and Weber, J.M. (2002) Accelerated substrate cycling: a new energy-wasting role for leptin *in vivo*, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **282**, 312–317.
- Шварц В. (2009) Жировая ткань как эндокринный орган, *Проблемы эндокринологии*, **55**, 38–44.
- Bartness, T.J., and Song, C.K. (2007) Thematic review series: adipocyte biology. Sympathetic and sensory innervation of white adipose tissue, *J. Lipid Res.*, **48**, 1655–1672.
- Bashan, N., Kovsan, J., Kachko, I., Ovadia, H., and Rudich, A. (2009) Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species, *Physiol. Rev.*, **89**, 27–71.
- Dringen, R. (2000) Glutathione metabolism and oxidative stress in neurodegeneration, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 4903.
- Gilge, J.L., Fisher, M., and Chai, Y.C. (2008) The effect of oxidant and the non-oxidant alteration of cellular thiol concentration on the formation of protein mixed-disulfides in HEK 293 cells, *PLoS One*, **3**, 4015.
- Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. (2009) Система глутатиона. I. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы, *Биомедицинская химия*, **55**, 255–277.
- Ojaimi, C., Kinugawa, S., Recchia, F.A., and Hintze, T.H. (2010) Oxidant-NO dependent gene regulation in dogs with type I diabetes: impact on cardiac function and metabolism, *Cardiovasc. Diabetol.*, **9**, 43–53.
- Boden, G. (1997) Role of fatty acid in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM, *Diabetes*, **46**, 3–10.
- Eriksson, J.W. (2007) Metabolic stress in insulin's target cells leads to ROS accumulation – a hypothetical common pathway causing insulin resistance, *FEBS Lett.*, **581**, 3734–3742.
- Иванов В.В., Стенникова М.П., Федорова Т.С. (2005) Влияние окислительного стресса на деградацию инсулина в адипоцитах *in vitro*, *Бюлл. сиб. мед.*, **4**, 91–92.
- Robertson, R.P. (2004) Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes, *Biol. Chem.*, **279**, 42351–42354.
- Lenzen, S. (2008) Oxidative stress: the vulnerable beta-cell, *Biochem. Soc. Trans.*, **36**, 343–347.
- Sztalryd, C., Xu, G., and Dorward, H. (2003) Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation, *Cell Biol.*, **160**, 1093–1103.
- Tsujita, T. (2006) Basal lipolysis in epididymal fat cells from streptozotocin-induced diabetic rats, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **52**, 47–53.
- Visentin, V., Prevot, D., Marti, L., and Carpenne, C. (2003) Inhibition of rat fat cell lipolysis by monoamine oxidase and semicarbazide-sensitive amine oxidase substrates, *Eur. J. Pharmacol.*, **466**, 235–243.
- Green, A., Rumberger, J.M., Stuart, C.A., and Ruhoff, M.S. (2004) Stimulation of lipolysis by tumor necrosis factor-alpha in 3T3-L1 adipocytes is glucose dependent: implications for long-term regulation of lipolysis, *Diabetes*, **53**, 74–81.
- Weisberg, S.P. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue, *Clin. Invest.*, **112**, 1796–1808.
- Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Иванов В.В., Носарева О.Л., Дзюман А.Н., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. (2014) Свободнорадикальное окисление белков и

- липидов в адипоцитах в условиях окислительного стресса, *Молекулярная медицина*, **1**, 59–64.
40. de Pina, M.Z., Vazquez-Meza, H., Pardo, J.P., Rendon, J.L., Villalobos-Molina, R., Riveros-Rosas, H., and Pina, E. (2008) Signaling the signal, cyclic AMP-dependent protein kinase inhibition by insulin-formed H₂O₂ and reactivation by thioredoxin, *Biol. Chem.*, **283**, 12373–12386.
41. Harwood, D.T., Kettle, A.J., and Winterbourn, C.C. (2006) Production of glutathione sulfonamide and dehydroglutathione from GSH by myeloperoxidase-derived oxidants and detection using a novel LC-MS/MS method, *Biochem. J.*, **399**, 161–168.
42. Иванов В.В., Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Жаворонок Т.В., Новицкий В.В. (2011) Влияние аллоксана на систему глутатиона и окислительную модификацию белков в адипоцитах при экспериментальном диабете, *Бюлл. сиб. мед.*, **10**, 44–47.

**EFFECT OF INSULIN, THE GLUTATHIONE SYSTEM
AND SUPEROXIDE ANION RADICAL IN MODULATION
OF LIPOLYSIS IN ADIPOCYTES OF RATS
WITH EXPERIMENTAL DIABETES**

**V. V. Ivanov, E. V. Shakhristova*, E. A. Stepovaya,
O. L. Nosareva, T. S. Fedorova, N. V. Ryazantseva,
V. V. Novitsky**

*Siberian State Medical University, Moscovski trakt 2,
Tomsk 634050, Russia; fax: 8(3822)53-33-09,
E-mail: office@ssmu.tomsk.ru, shaxristova@yandex.ru*

Received May 14, 2014

Revision received July 18, 2014

It was found that spontaneous lipolysis increases in adipocytes of rats with alloxan diabetes; besides, isoproterenol-stimulated hydrolysis of triacylglycerols is inhibited against the background of oxidative stress and decrease redox-status of cells. A decrease in the ability of insulin to inhibit isoproterenol-stimulated lipolysis in adipocytes that were isolated from adipose tissue of rats with experimental diabetes was detected, which shows a disorder in regulation of lipolysis in adipocytes by the hormone in alloxan diabetes. Based on these findings, it was concluded that there is an influence of reactive oxygen species, superoxide anion radical, in particular, and redox-potential of the glutathione system on molecular mechanisms of change of lipolysis intensity in rat adipocytes in alloxan-induced oxidative stress. Activation of spontaneous lipolysis in conditions of oxidative stress may be one of the reasons for the high concentration of free fatty acids in blood plasma in experimental diabetes, and this may play a significant role in development of insulin resistance and appearance of complications of diabetes.

Key words: diabetes mellitus, adipocyte, oxidative stress, lipolysis, glutathione system, Mn-tetra (N-methyl-4-pyridyl) porphyrin, N-ethylmaleimide