

УДК 577.15:616.379-008.64

ВОЗДЕЙСТВИЕ 10-(6'-ПЛАСТОХИНОЛ)- ДЕЦИЛТРИФЕНИЛФОСФОНИУМА (SkQ1) НА ОКСИДАТИВНЫЙ СТАТУС ПРИ ГИПЕРГЛИКЕМИИ У КРЫС, ВЫЗВАННОЙ ВВЕДЕНИЕМ ПРОТАМИН- СУЛЬФАТА

© 2015 Я.Г. Воронкова¹, Т.Н. Попова^{1*}, А.А. Агарков¹,
М.В. Скулачев²

¹ Воронежский государственный университет,
биолого-почвенный факультет, 394006 Воронеж;
электронная почта: trorova@bio.vsu.ru

² НИИ Митохонгенери, Московский государственный
университет им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва;
электронная почта: info@skq-project.ru

Поступила в редакцию 07.04.15
После доработки 23.07.15

Исследовали влияние 10-(6'-пластохинол)децилтрифенилфосфониума (SkQ1) на окислительный статус и активность некоторых антиоксидантных ферментов в печени и сыворотке крови крыс при экспериментальной гипергликемии, вызванной введением протаминсульфата. Воздействие SkQ1 приводило к уменьшению уровня гликемии у крыс, индуцируемой протаминсульфатом. Установлено, что введение данного вещества при патологии сопровождалось изменением значений параметров биохемилюминесценции, отражающих скорость протекания свободнорадикальных процессов, содержания уровня первичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – диеновых конъюгатов, активности аконитатгидратазы и содержания цитрата в печени и сыворотки крови крыс в сторону контрольных значений. При этом выявлено, что активность супероксиддисмутазы и каталазы, возрастающая при гипергликемии, снижалась при воздействии SkQ1 на фоне патологии. Это может быть связано со способностью SkQ1 нормализовать свободно-радикальный гомеостаз, дисбаланс которого наблюдается при гипергликемии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гипергликемия, SkQ1, свободно-радикальное окисление, биохемилюминесценция, супероксиддисмутаза, каталаза, аконитатгидратаза, цитрат.

Проблема гипергликемии и сахарного диабета (СД) относится к наиболее актуальным проблемам современной медицины. Известно, что у больных СД уровень смертности от ишемической болезни сердца, мозгового инсульта и общей смертности, в целом, значительно больше, чем у лиц без метаболических нарушений [1]. Развитие патологических изменений печени у пациентов, страдающих СД, впервые было описано Фридрихом Теодором фон Фрерихсом. Отсюда в клинической практике появились термины «диабетический гепатоз» и «жировой гепатоз» [2, 3]. В первую очередь, это обусловлено глюкозотоксичностью, т.е. состоянием длительной гипергликемии. Глюкозотоксичность способствует десенситизации β -клеток, являющейся следствием образования продуктов обмена глюкозы – гексозаминов, в гексозаминовом шунте [4].

Активация функционирования данного метаболического пути в условиях гипергликемии, а также полиолового шунта могут быть причиной интенсификации образования свободных радикалов (СР) [5]. Кроме этого, аутоокисление глюкозы и ее метаболических интермедиатов [6], неферментативное или аутоокислительное гликозилирование белков [7], накопление триозофосфатов, приводящее к образованию карбонильных соединений и повышение интенсивности процессов окислительного фосфорилирования [8] могут также играть роль в активации процессов свободнорадикального окисления (СО) в условиях гипергликемии. Необходимо отметить, что при хроническом повышении уровня глюкозы в крови чрезмерно увеличивается продукция супероксида митохондриями [8], цитохромом P-450, ксантиноксидазой, протеинкиназой C-зависимой НАДН/НАДФН-оксидазой [7]. Ишемия, гипоксия и псевдогипоксия

* Адресат для корреспонденции.

тканей, наблюдаемые при этом, являются дополнительными факторами, которые способствуют повышенному образованию реактивных оксидантов в различных органах и тканях [9, 10].

Значительное увеличение выработки активных форм кислорода (АФК) и высвобождение каталитически активных ионов Fe^{2+} из вне- и внутриклеточных депо может способствовать разрушению Fe-S-кластеров в активном центре аконитатгидратазы (АГ) свободными радикалами, в связи с чем данный фермент считают критической мишенью действия АФК при развитии окислительного стресса [11–13]. При снижении активности АГ может происходить накопление субстрата данного фермента – цитрата, способного участвовать в регуляции уровня СО путем хелатирования ионов металлов переменной валентности.

Повышенный уровень АФК, имеющий место в условиях гипергликемии, вызывает инициацию ПОЛ в биомембранах [5], что приводит к накоплению продуктов этого процесса.

Развитию оксидативного стресса противостоит многоуровневая система антиоксидантной защиты организма [14–17], значительное место в которой отведено супероксиддисмутазе (СОД) и каталазе, поскольку именно эти ферменты нейтрализуют первичные АФК выше – O_2^- и H_2O_2 , способные участвовать в реакциях образования других, более реакционно-способных свободных радикалов [18]. Однако часто собственного резерва соединений с антиоксидантной активностью оказывается недостаточно для нейтрализации большого количества образующихся при гипергликемии радикалов. В связи с этим исследование веществ, обладающих антиоксидантным эффектом, при патологиях, сопряженных с оксидативным стрессом, в настоящее время является весьма актуальным.

10-(6'-пластохинол)децилтрифенилфосфониума (SkQ1) является высокоэффективным, митохондриально-направленным антиоксидантом. Это вещество состоит из пластохинона (Q), осуществляющего антиоксидантную защиту, проникающего катиона (Sk), обеспечивающего доставку вещества в митохондрии, и деканового линкера. Соединения класса SkQ являются регенерируемыми антиоксидантами многократного действия и, осуществив антиоксидантную защиту, могут быстро восстанавливаться комплексом 3 дыхательной цепи митохондрий для повторного антиоксидантного акта [19].

Целью данной работы явилась оценка влияния SkQ1 на параметры биохимилюминесценции (БХЛ), отражающие скорость протекания свободно-радикальных процессов, уровень первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов

(ДК), активность СОД и каталазы, АГ и содержание цитрата в печени и сыворотки крови крыс при гипергликемии, вызванной введением протаминсульфата.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использовали самцов белых лабораторных крыс (*Rattus rattus* L.) массой 150–200 г. Все процедуры эксперимента соответствовали требованиям Международных правил гуманного отношения к животным, отраженным в Санитарных правилах по отбору и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

Гипергликемию вызывали путем внутримышечного введения протаминсульфата в течение трех недель в дозе 10 мг/кг массы тела животного в объеме 0,5 мл 0,9%-ного NaCl (три раза в сутки) [20]. Известно, что инсулин в комплексе с гепарином оказывает более сильное гипогликемическое действие [21, 22]. Напротив, связывание эндогенного гепарина протаминсульфатом повышает диабетогенный эффект, например, аллоксана и диабетогенного фактора плазмы крови [23], а при связывании протаминсульфатом всего имеющегося в циркуляции эндогенного гепарина у здоровых крыс развивается состояние резистентности по отношению к гипогликемическому действию как эндогенного, так и экзогенного инсулина [24]. Резистентность к инсулину эффективно устраняется путем введения таким животным гепарина [25].

Через три недели после того как была вызвана гипергликемия наркотизированных животных умерщвляли и использовали для дальнейших исследований. Эксперимент проводили на крысах, разделенных на три группы: первую группу ($n = 12$) составляли животные, которых содержали на стандартном режиме вивария; вторую группу ($n = 12$) – крысы с гипергликемией, вызванной введением протаминсульфата и третью группу ($n = 12$) – животные с гипергликемией, которым внутрибрюшинно вводили SkQ1 в виде раствора в дозе 1250 нмоль/кг один раз в сутки, начиная со второй недели.

Для получения тканевого гомогената навеску ткани печени гомогенизировали в четырехкратном объеме охлажденной среды выделения (0,1 М Tris-HCl-буфер, pH 7,8, содержащий 1 мМ ЭДТА, 1%-ный β -меркаптоэтанол) и центрифугировали при 10 000 g в течение 15 мин. Для получения сыворотки использовали венозную кровь.

Наличие гипергликемии подтверждали путем измерения содержания глюкозы в сыворотке крови из хвостовой вены с помощью набора реактивов фирмы «Vital Diagnosticum».

Оценку интенсивности процессов СО и общей антиоксидантной активности осуществляли методом Fe^{2+} -индуцированной биофлуоресценции. Принцип метода основан на каталитическом разложении пероксида ионами металла с переходной валентностью (Fe^{2+}) в соответствии с реакцией Фентона. Образующиеся при этом СР вступают в процесс инициации СО в исследуемом биологическом субстрате. Рекомбинация радикалов RO_2 приводит к образованию неустойчивого тетроксидов, распадающегося с выделением кванта света. Кинетическую кривую БХЛ регистрировали в течение 30 с на БХЛ-07 (ООО «Медозонс», Россия) с программным обеспечением и определяли следующие параметры: светосумму хемилюминесценции (S), интенсивность вспышки (I_{max}), характеризующие интенсивность СО, и величину тангенса угла наклона кривой ($tg\alpha_2$), отражающую общую антиоксидантную активность.

Среда для определения интенсивности БХЛ имела следующий состав: 0,4 мл 0,02 М калий-фосфатного буфера, рН 7,5, 0,4 мл 0,01 М $FeSO_4$, 0,2 мл 2%-ного раствора H_2O_2 (вносимого непосредственно перед измерением). Исследуемый материал вносили в количестве 0,1 мл перед измерением.

Содержание ДК определяли спектрофотометрическим методом. Принцип метода состоит в том, что в ходе ПОЛ на стадии образования СР в молекулах полиненасыщенных жирных кислот возникает система сопряженных двойных связей, что сопровождается появлением максимума в спектре поглощения при 233 нм [26].

Активность АГ (аконитатгидрогеназа) определяли на спектрофотометре Hitachi U-1900 («Hitachi High-Technologies», Япония) с программным обеспечением при 233 нм в среде, содержащей 0,05 М Tris-HCl-буфер, рН 7,8, 4 мМ цитрат [27]. За ферментативную единицу (Е) принимали количество фермента, необходимого для превращения 1 мМ субстрата за 1 мин при 25°. Количество цитрата определяли по методу Нательсона [28].

Активность СОД определяли по ингибированию скорости восстановления тетразолия нитросинего (НСТ) в неэнзиматической системе феназметасульфата (ФМС) и НАДН. Среда инкубации (3 мл) содержала 0,1 М фосфатный буфер, рН 7,8, 0,33 мМ ЭДТА, 0,41 мМ НСТ (нитросиний тетразолиевый), 0,01 мМ ФМС и 0,8 мМ НАДН. Активность регистрировали спектрофотометрически по приросту экстинкции через 5 мин на спектрофотометре Hitachi U1900 при 540 нм [29].

Активность каталазы определяли при 410 нм с помощью метода, основанного на способнос-

ти пероксида водорода образовывать с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс [30].

В ходе работы использовали протаминсульфат, Tris-HCl, цитрат, тетразолий нитросиний, феназметасульфат, НАДН («Sigma», США), SkQ1 синтезированный по методике, описанной в [19], ЭДТА («Reanal», Венгрия), остальные реактивы отечественного производства марки «хч» или «чда».

Опыты проводили как минимум в 12-кратной биологической и двукратной аналитической повторностях. Результаты опытов сравнивали с контролем. Данные обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента с вычислением среднего значения, стандартного отклонения, различия считали достоверными при $p \leq 0,05$ [31].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что введение крысам с патологией SkQ1 приводило к снижению уровня гликемии (в случае патологии повышается в 2,7 раза) (рис. 1). Например, при введении SkQ1 на 19-й день эксперимента концентрация глюкозы в крови снижалась в 2 раза (рис. 1). Имеются данные, что повышенная продукция СР при увеличении уровня гликемии вызывает активацию основных стрессчувствительных факторов (протеинкиназа-С (ПКС), ядерный фактор транскрипции (NFκ-B), митогенактивирующая протеинкиназа (p38MAPK)), усугубляющих инсулинорезистентность и снижающих компенсаторные возможности инсулярного аппарата [32]. Вероятно, снижение концентрации глюкозы при введении SkQ1 крысам с индуцированной гипергликемией может быть связано с реализацией антиоксидантных свойств данного вещества, что приводит к удалению СР с последующим снижением активности ПКС, NFκ-B [33], экспрессии индуцибельной NO-синтазы, в результате чего не происходит повышения продукции NO и последующего образования пероксинитрита – мощного прооксиданта, являющегося важным фактором, вызывающим апоптоз β-клеток [18].

Кроме того, было показано, что при развитии гипергликемии, вызванной введением протаминсульфата, значение светосуммы БХЛ (S) увеличивалось в печени крыс в 2,6 раза, в сыворотке крови – в 2,4 раза, интенсивность максимальной вспышки БХЛ (I_{max}) – в 2,1 и 2,0 соответственно, относительно показателей у контрольных животных (таблица), что свидетель-

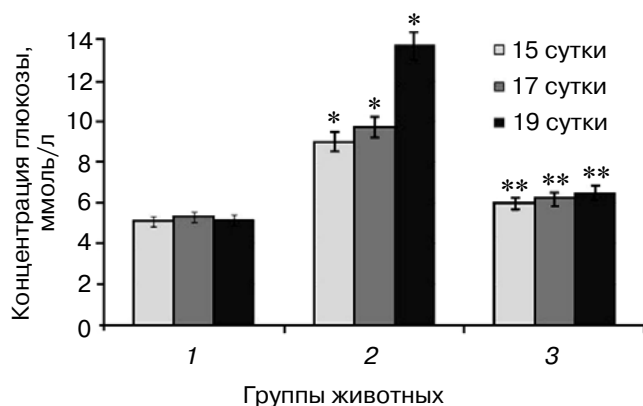


Рис. 1. Концентрация глюкозы в крови крыс контрольной группы (1), животных с гипергликемией, вызванной введением протаминсульфата (2), и при введении SkQ1 животным с патологией (3) на 15-, 17- и 19-е сутки эксперимента (различия достоверны при $p \leq 0,05$; * по сравнению с контрольной группой, ** по сравнению с группой с экспериментальной гипергликемией, для всех рисунков 1–6)

ствует о возрастании интенсивности СО в условиях эксперимента. При этом окислительный стресс может быть следствием различных механизмов: повышенного образования реактивных оксидантов, возникающих при окислении как самих углеводов, так и углеводов, формирующих комплексы с различными белками, а также в результате аутоокисления жирных кислот в триглицеридах, фосфолипидах и эфирах холестерина; нарушения ферментов полиолового обмена глюкозы, митохондриального окисления, обмена простагландинов и лейкотриенов, снижения активности глиоксалазы и др. [4].

О мобилизации компенсаторных механизмов, направленных на снижение уровня СО в организме, при патологии можно судить по уве-

личению значения $\text{tg}\alpha_2$ БХЛ, характеризующего общую антиоксидантную активность организма. Данный параметр возрастал в печени в 2,1 раза, в сыворотке крови животных с гипергликемией – в 2,2 раза по сравнению с контролем (таблица).

При введении SkQ1 крысам с патологией наблюдалось снижение S БХЛ в печени в 1,6 раза, в сыворотке крови – в 2,3 раза по сравнению с величиной показателей при СД2. При этом происходило уменьшение I_{max} в печени в 1,9 раза, в сыворотке крови – в 1,8 раза (таблица). Полученные данные могут быть объяснены с точки зрения проявления антиоксидантных свойств SkQ1 [34]. Помимо этого, в ходе эксперимента под воздействием SkQ1 зарегистрировано снижение $\text{tg}\alpha_2$ в печени – в 1,6 раза и в сыворотке – в 1,7 раза по сравнению с группой животных с данной патологией (таблица). Известно, что SkQ1 способен влиять на процессы ПОЛ, снижая при этом интенсивность свободно-радикальных процессов и позволяя нормализовать или частично компенсировать угнетение активности антиоксидантных ферментов [34].

Установлено, что при гипергликемии, вызванной введением протаминсульфата, происходит возрастание уровня ДК, относящихся к токсическим метаболитам, которые оказывают повреждающее действие на липопротеиды, белки, ферменты и нуклеиновые кислоты. Так, концентрация ДК увеличивалась в печени в 4,1 раза (рис. 2, а), в сыворотке крови крыс – в 1,6 раза (рис. 2, б) по сравнению с контрольным уровнем. Не исключено, что обнаруженное увеличение уровня ДК является одним из факторов, участвующих в патогенезе микроангиопатий [4, 14].

При введении SkQ1 наблюдалось снижение содержания определяемых первичных продуктов ПОЛ в печени – в 2,2 раза (рис. 2, а), в сыво-

Параметры биофлуоресценции в печени и сыворотке крови крыс контрольной группы, животных с гипергликемией, вызванной введением протаминсульфата и SkQ1 животным с патологией

| Параметры биофлуоресценции | Контроль | | Гипергликемия, вызванная введением протаминсульфата | | Воздействие SkQ1 при гипергликемии, вызванной введением протаминсульфата | |
|----------------------------|-------------|---------------|---|----------------|--|----------------|
| | печень | сыворотка | печень | сыворотка | печень | сыворотка |
| I_{max} , mV | 42,01 ± 1,8 | 25,19 ± 1,1 | 86,66 ± 2,9* | 51,15 ± 1,9* | 46,73 ± 2,1** | 28,12 ± 1,1** |
| S, mV · с | 92,31 ± 3,4 | 307,71 ± 12,1 | 236,07 ± 9,2* | 739,76 ± 23,2* | 145,45 ± 5,4** | 315,47 ± 9,6** |
| $\text{tg}\alpha$ | 8,12 ± 0,2 | 13,33 ± 0,4 | 16,65 ± 0,5* | 29,47 ± 1,2* | 9,93 ± 0,28** | 16,95 ± 0,4** |

Примечание. Различия достоверны при $p \leq 0,05$; * по сравнению с контрольной группой, ** по сравнению с группой с экспериментальной гипергликемией.

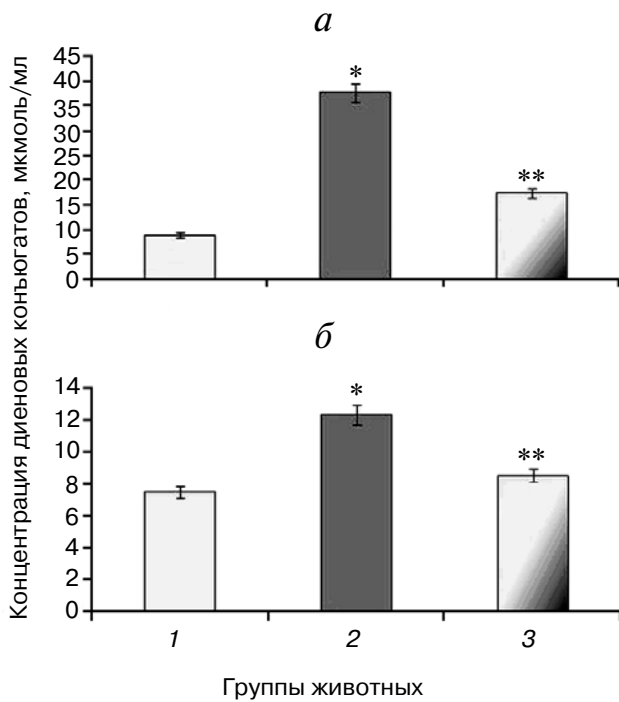


Рис. 2. Содержание диеновых конъюгатов в печени (а) и сыворотке крови (б) крыс контрольной группы (1), животных с гипергликемией, вызванной введением протаминасульфата (2) и при введении SkQ1 животным с гипергликемией (3)

ротке – в 1,4 раза (рис. 2, б) по сравнению с патологией, что свидетельствует о тормозящем воздействии данного вещества на процессы ПОЛ. В присутствии SkQ1 активность дыхательных комплексов находится на достаточно высоком уровне. Это может быть обусловлено способностью антиоксиданта нормализовать продукцию АФК, ингибирующих активность ключевых ферментов цикла Кребса [34]. Интенсивность процессов ПОЛ в значительной мере зависит и от уровня металлов переменной валентности, в частности Fe^{2+} , концентрация которых может возрастать при разрушении Fe-S-кластера АГ СР [11–13].

Выявлено, что при гипергликемии, вызванной введением протаминасульфата, у крыс происходит уменьшение удельной активности АГ – маркера окислительного стресса, в печени и сыворотке крови крыс в 1,9 и 2,8 раза соответственно (рис. 3, а, б соответственно), активности, выраженной в виде Е на грамм сырой массы печени – в 1,5 раза (рис. 3, в), в виде Е на мл сыворотки – в 2,1 раза (рис. 3, г). Накопление СР в условиях гипергликемии способствовало деструкции активного центра фермента и потере его активности [35, 36]. При введении SkQ1 крысам с патологией выявлено увеличение удельной ак-

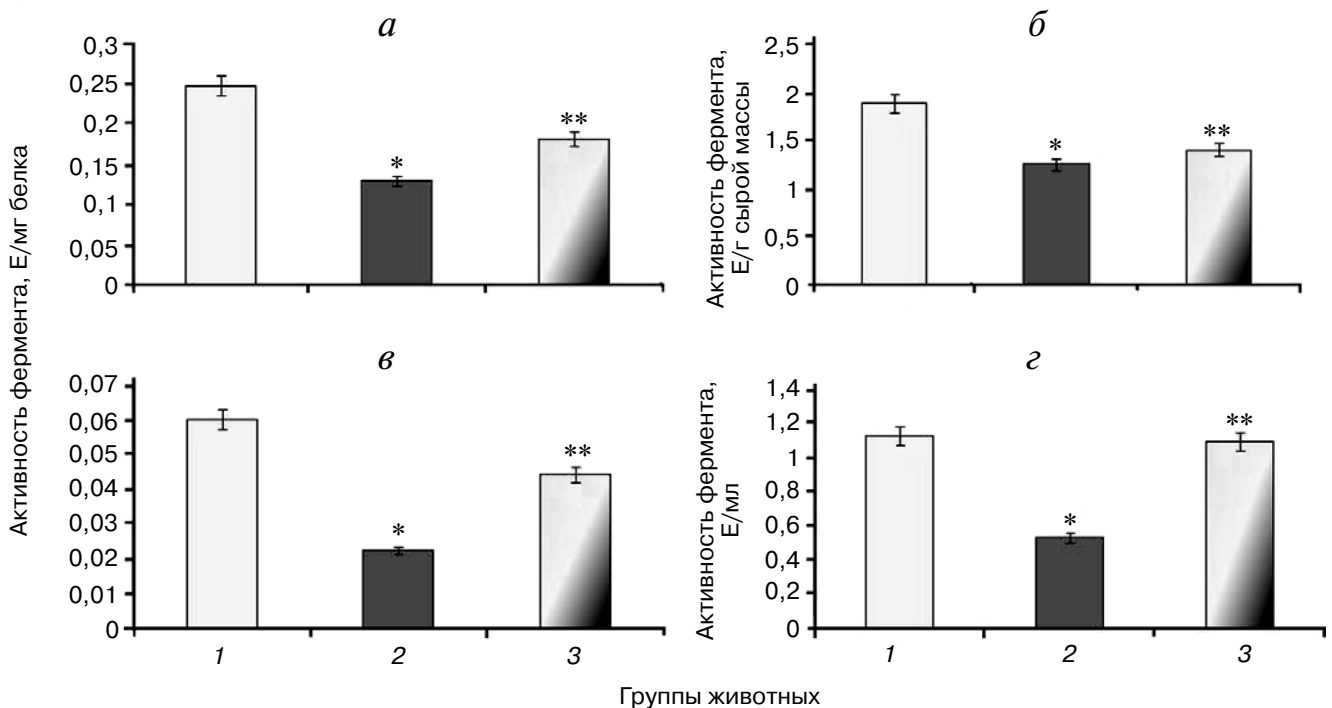


Рис. 3. Активность аконитатгидратазы у крыс контрольной группы (1), животных с гипергликемией, вызванной введением протаминасульфата (2) и при введении SkQ1 животным с патологией (3): а – удельная активность фермента в печени; б – удельная активность фермента в сыворотке крови; в – активность аконитатгидратазы, выраженная в виде Е на грамм сырой массы печени; г – активность аконитатгидратазы (Е на мл сыворотки)

тивности АГ в печени и сыворотке крови крыс соответственно в 1,4 и 1,9 раза (рис. 3, *а, б* соответственно). Также возросла активность фермента (выраженная в виде Е на грамм сырой массы печени) в 1,1 раза (рис. 3, *в*) и Е на мл сыворотки — в 2,0 раза (рис. 3, *г*). По-видимому, вследствие проявления антиоксидантных свойств SkQ1 снижается степень свободнорадикального повреждения молекул фермента, что и сказывается на его активности.

Наряду со снижением активности АГ при патологии имеет место повышение содержания низкомолекулярного антиоксиданта цитрата — субстрата данного фермента, по-видимому, вследствие нарушения его утилизации [37]. У животных с экспериментальной гипергликемией, вызванной введением протаминсульфата, обнаружено увеличение содержания цитрата в 2,3 раза в печени (рис. 4, *а*) и в 2,7 раза — в сыворотке крови (рис. 4, *б*). Введение SkQ1 в исследуемой дозе приводило к двукратному снижению уровня цитрата в печени (рис. 4, *а*), в сыворотке крови концентрация данного интермедиа падала в 1,7 раза (рис. 4, *б*) относительно патологии. Вероятно, при введении SkQ1 происходило возрастание антиоксидантного потенциала и изменение уровня цитрата в сторону нормы.

В ходе исследований установлено, что у животных с гипергликемией, вызванной введением протаминсульфата, происходит увеличение удельной активности СОД в печени и в сыворотке крови в 2,6 и 1,9 раза соответственно (рис. 5, *а, б* соответственно) по сравнению с контрольными животными. Активность фермента, выраженная в виде Е на грамм сырой массы печени, возросла в 2,0 раза (рис. 5, *в*), в виде Е на мл сыворотки — в 1,5 раза (рис. 5, *г*). По-видимому, увеличение продукции супероксида митохондриями, наблюдаемое в условиях хронической гипергликемии [7, 8], приводит к компенсаторному увеличению активности СОД. Известно 4 изофермента супероксиддисмутазы: цитоплазматическая, внеклеточная и экстрацеллюлярная СОД, в составе гема которых находятся такие металлы, как Zn^{2+} и Cu^{2+} , митохондриальная СОД, содержащая Mn^{2+} [38]. Предполагают, что экстрацеллюлярная СОД выполняет функцию защиты клеток эндотелия во всем организме. Защитное действие плазматической СОД связывают с обезвреживанием не только супероксидного анионрадикала, но и гидроксильного радикала. Так, при введении препаратов СОД с каталазой было показано, что внеклеточная СОД оказывала более выраженное действие в процессе снижения АФК, чем внутриклеточная [39]. Вероятно, кроме экстрацеллюлярной СОД, сывороточный пул данного фермента могут составлять и

другие изоферменты СОД, вышедшие из клеток вследствие их гибели. Как известно, при развитии СД происходит активация апоптотических процессов [40].

При введении SkQ1 животным с данной патологией отмечалось снижение удельной активности СОД в печени и сыворотке крови крыс в 1,7 и 1,5 раза соответственно (рис. 5, *а, б* соответственно). Активность фермента, выраженная в виде Е на грамм сырой массы печени и Е на мл сыворотки, снижалась в 1,6 и 1,4 раза соответственно (рис. 5, *в, г* соответственно). Известно, что SkQ1 способен проявлять антиоксидантные свойства за счет наличия в его структуре пластохинона. Кроме того, SkQ1 является липофильной молекулой, что позволяет ей проникать внутрь клетки [32]. Вероятно, это способствовало снижению нагрузки на исследуемый фермент, что сопровождалось изменением его активности в сторону контрольных значений.

Выявлено, что развитие гипергликемии у крыс, вызванной введением протаминсульфата, сопровождается ростом удельной активности каталазы в печени и в сыворотке крови в 2,7 раза (рис. 6, *а, б* соответственно) по сравнению с контрольными животными. Активность фер-

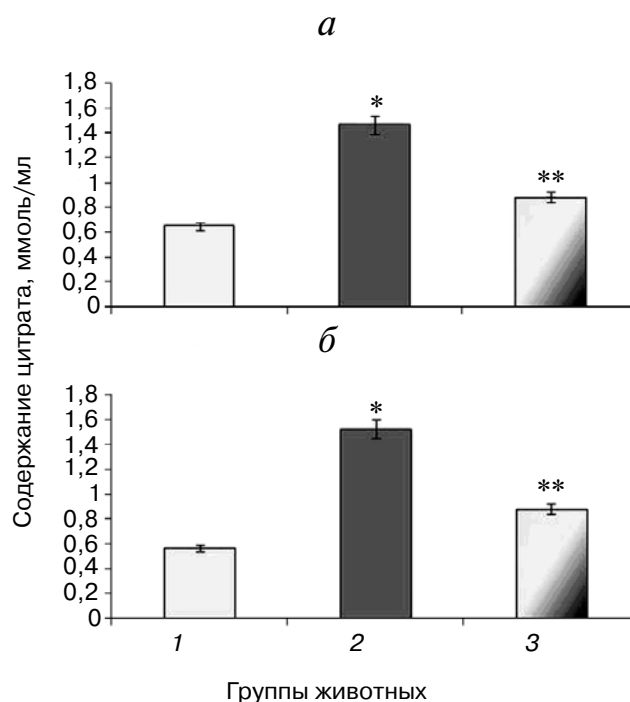


Рис. 4. Содержание цитрата в печени (*а*) и сыворотке крови (*б*) крыс контрольной группы (1), животных с гипергликемией, вызванной введением протаминсульфата (2) и при введении SkQ1 животным с патологией (3)

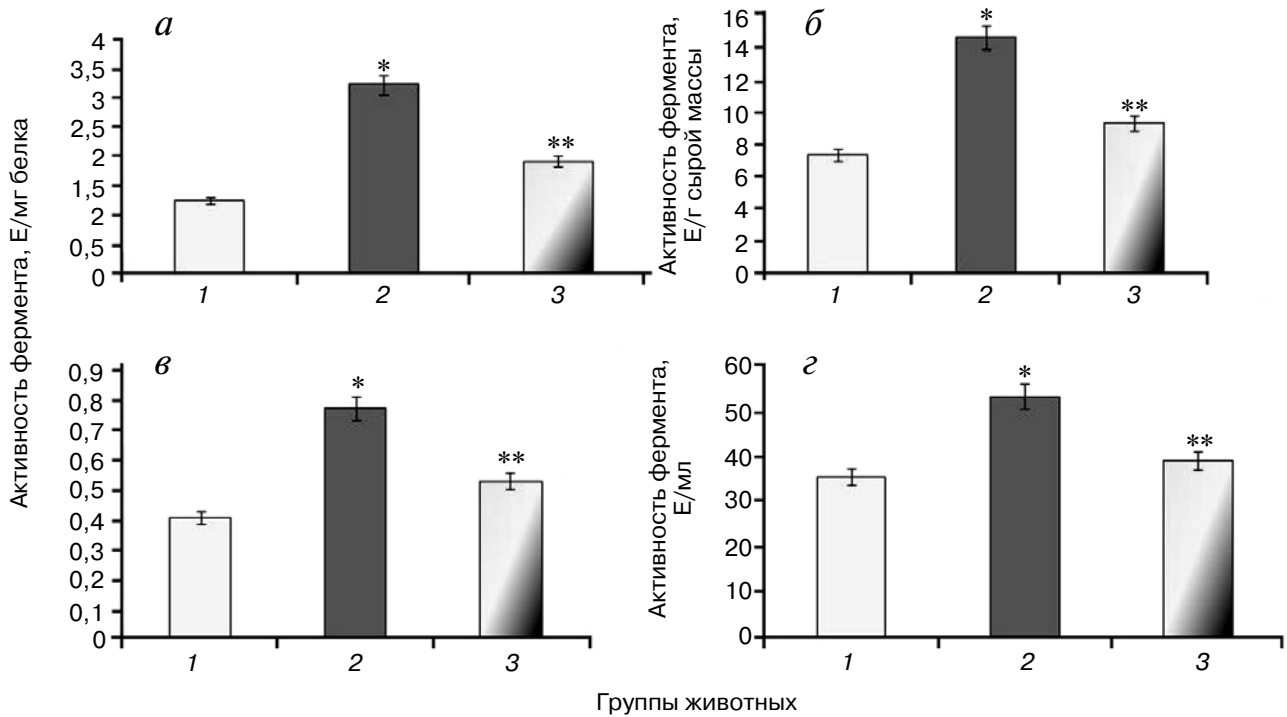


Рис. 5. Активность супероксиддисмутазы у крыс контрольной группы (1), животных с гипергликемией, вызванной введением протаминсульфата (2) и при введении SkQ1 животным с патологией (3): а – удельная активность фермента в печени; б – удельная активность фермента в сыворотке крови; в – активность аконитатгидратазы, выраженная в виде Е на грамм сырой массы печени; г – активность аконитатгидратазы (Е на мл сыворотки)

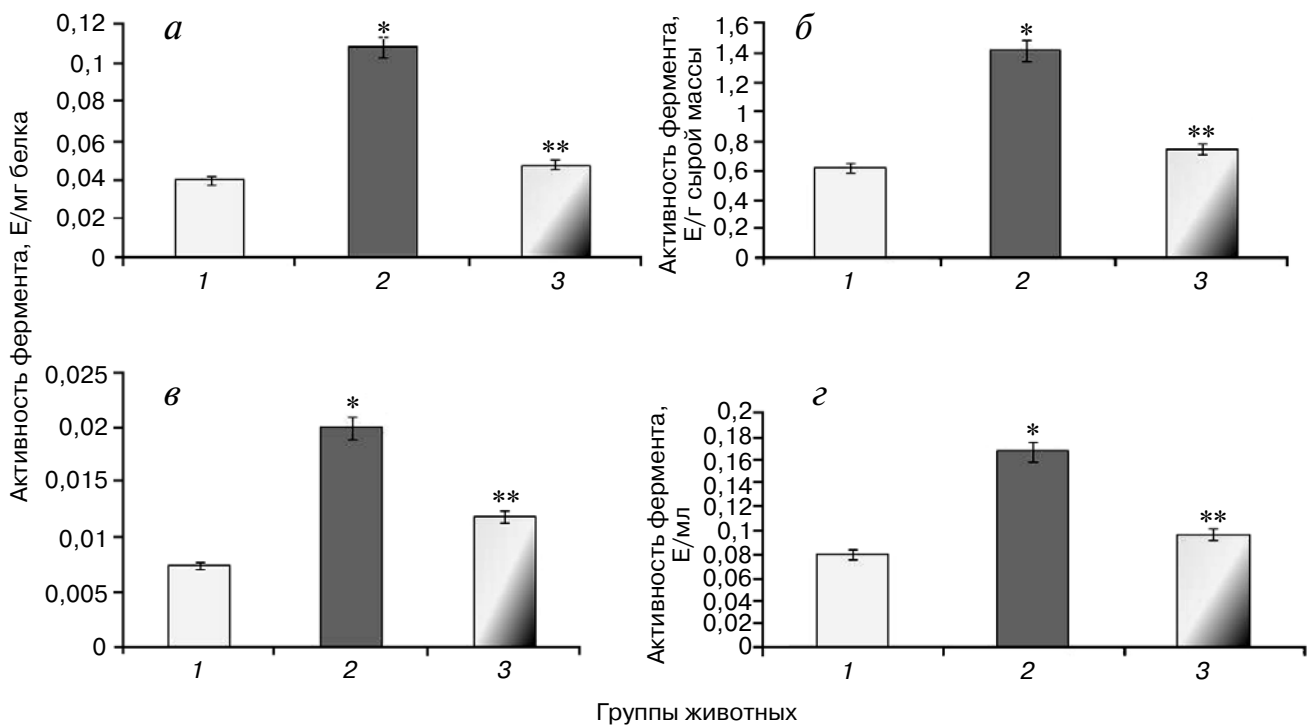


Рис. 6. Активность каталазы у крыс контрольной группы (1), животных с гипергликемией, вызванной введением протаминсульфата (2) и при введении SkQ1 животным с патологией (3): а – удельная активность фермента в печени; б – удельная активность фермента в сыворотке крови; в – активность аконитатгидратазы, выраженная в виде Е на грамм сырой массы печени; г – активность аконитатгидратазы (Е на мл сыворотки)

мента, выраженная в виде Е на грамм сырой массы печени и Е на мл сыворотки, возрастала в 2,3 и 2,1 раза соответственно (рис. 6, в, г соответственно).

При введении SkQ1 было отмечено уменьшение удельной активности каталазы в печени и сыворотке крови животных в 2,2 раза и 1,6 раза соответственно (рис. 6, а, б соответственно). Также было выявлено уменьшение активности фермента, выраженной в виде Е на грамм сырой массы печени (в 1,9 раза) (рис. 6, в) и Е на мл сыворотки (в 1,7 раза) (рис. 6, г).

Полученные результаты свидетельствуют, что реализация антиоксидантного потенциала, вводимого животным SkQ1, обеспечивала позитивное воздействие на свободно-радикальный гомеостаз организма, что приводило к снижению степени мобилизации антиоксидантной системы клетки и, в частности, каталазы.

Таким образом, введение SkQ1 при гипергликемии у крыс, вызванной введением протаминсульфата, приводит к снижению уровня СО,

что находит свое отражение в снижении значений параметров БХЛ: S и I_{\max} , отражающих скорость свободнорадикальных процессов, концентрации первичных продуктов ПОЛ – ДК, активности АГ – чувствительной мишени действия АФК, и концентрации цитрата, а также изменению активности ферментов антиоксидантной системы в сторону контроля. Очевидно, это может быть связано с реализацией антиоксидантного эффекта SkQ1. Снижение концентрации глюкозы при введении крысам с гипергликемией SkQ1 могло быть сопряжено с его воздействием на активность ряда факторов, способствующих усилению свободно-радикальных процессов и усугубляющих инсулинорезистентность.

Коллектив авторов благодарит директора Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Скулачева Владимира Петровича за внимание к работе и ценные замечания при подготовке статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чазова В.Б., Мычка В.Б. (2003) Метаболический синдром, сахарный диабет 2 типа и артериальная гипертензия, *Сердце*, **3**, 32–38.
2. Байжанова Ж.Ж., Игнатова Т.М., Северова М.М., Бурневич Э.З. (2012) Стеатоз печени и инсулинорезистентность при хроническом гепатите С, *Фармака*, **7**, 26–29.
3. Von Frerichs, Fr.Th. (1884) *Ueber den Diabetes*, Berlin, 272.
4. Балаболкин М.И., Креминская В.М., Клебанова Е.М. (2005) Роль окислительного стресса в патогенезе диабетической нейропатии и возможность его коррекции препаратами α -липоевой кислоты, *Пробл. эндокринолог.*, **51**, 22–33.
5. de Haan, J.B., Stefanovic, N., and Nikolic-Paterson, D. (2005) Kidney expression of glutathione peroxidase-1 is not protective against streptozotocin-induced diabetic nephropathy, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **289**, 544–551.
6. Martinov, M.V. (2010) The logic of the hepatic methionine metabolic cycle, *Biochim. Biophys. Acta*, **1**, 89–96.
7. Кондратьева Е.И., Косянкова Т.В. (2002) Гены синтеза оксида азота в патогенезе сахарного диабета и его осложнений, *Пробл. эндокринолог.*, **2**, 33–37.
8. Воскресенский О.Н. (2002) Антиоксидантная система, онтогенез и старение, *Вопр. мед. хим.*, **1**, 14–27.
9. Alonso-Magdalena, P., Ropero, A.B., Soriano, S., Quesada, I., and Nadal, A., (2010) Bisphenol-A: a new diabetogenic factor? *Hormones (Athens)*, **9**, 118–126.
10. Krotz, F. (2009) NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment, *Blood*, **100**, 917–924.
11. Скулачев В.П. (2000) *Кислород и явления запрограммированной смерти*, ИБХ РАМН, Москва, стр. 47.
12. Beinert, H. (1986) Iron-sulfur clusters: agents of electron transfer and storage, and direct participants in enzymic reactions, *Biochem. Soc. Trans.*, **14**, 527–533.
13. Eberly, D., Clanke, R., and Kaplowitz, N. (1981) Rapid oxidation *in vitro* of endogenous and exogenous glutathione in bile of rats, *J. Biol. Chem.*, **256**, 2115–2117.
14. Северин Е.С. (2008) *Биохимия*, ГЭОТАР-Медиа, Москва, с. 768.
15. Занозина О.В., Боровков Н.Н., Шербатюк Т.Г. (2010) Свободно-радикальное окисление при сахарном диабете 2-го типа: источники образования, составляющие, патогенетические механизмы токсичности, *Совр. технол. мед.*, **3**, 104–112.
16. Казимирко В.К., Мальцев В.И., Бутылин В.Ю., Горобец Н.И. (2004) *Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия*, Морион, Киев, стр. 160.
17. Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., and Grodsky, G.M. (2009) Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes, *Endocr. Rev.*, **23**, 599–622.
18. Lin, K.T., Xue, J.Y., and Nomen, M.J. (1995) Peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells, *Biol. Chem.*, **270**, 16487–16490.
19. Антоненко Ю.Н., Аветисян А.В., Бакеева Л.Е., Черняк Б.В., Чертков В.А., Домнина Л.В., Иванова О.Ю., Изюмов Д.С., Хайлова Л.С., Клишин С.С., Коршунова Г.А., Лямзаев К.Г., Мунтян М.С., Непряхина О.К., Пашковская А.А., Плетюшкина О.Ю., Пустовидко А.В., Рогинский В.А., Рокицкая Т.И., Рууге Э.К., Сапрунова В.Б., Северина И.И., Симонян Р.А., Скулачев И.В., Скулачев М.В., Сумбатьян Н.В., Свириева И.В., Ташлицкий В.Н., Васильев Ю.М., Высоких М.Ю., Ягужинский Л.С., Замятнин А.А., Скулачев В.П. (2008) Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения катионные производные пластохинона: синтез и исследование *in vitro*, *Биохимия*, **73**, 1589–1606.
20. Ульянов А.М., Тарасов Ю.А. (2000) Инсулярная система животных при хроническом дефиците гепарина, *Вопр. мед. хим.*, **2**, 149–154.

21. Кудряшов Б.А., Пытель Ю.А., Ляпина Л.А., Баскакова Г.М. (1981) Комплекс инсулин–гепарин, его физиологические свойства, *Вопр. мед. хим.*, **27**, 547–552.
22. Ульянов А.М., Шапиро Ф.Б., Ляпина Л.А. (1989) Гипогликемическая активность комплекса инсулин–гепарин и условия ее проявления, *Патол. физиол. эксперим. тер.*, **1**, 54–56.
23. Кудряшов Б.А., Ульянов А.М., Тарасов Ю.А. (1989) Усиление протаминам сульфата диабетогенного действия аллоксана, *Вопр. мед. хим.*, **35**, 128–131.
24. Kudrjashov, B.A., Shapiro, F.B., and Ulyanov, A.M. (1987) Role of heparin of realization of hypoglycaemic action of insulin, *Acta Physiol. Hung.*, **69**, 197–202.
25. Ульянов А.М., Шапиро Ф.Б., Базазьян Г.Г. (1987) Снижение чувствительности к гипогликемическому действию инсулина у животных с пониженной концентрацией гепарина в крови, *Бюлл. эксперим. биол. мед.*, **103**, 522–524.
26. Стальная И.Д. (1977) *Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот. Современные методы в биохимии*, Медицина, Москва, с. 63–64.
27. Бузлама В.С., Рецкий М.И., Мещеряков Н.П., Рогачева Т.Е. (1997) Методическое пособие по изучению процессов перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты организма у животных, Воронеж, стр. 67.
28. Афанасьев В.Г., Зайцев В.С., Вольфсон Т.И. (1973) К микрометоду определения лимонной кислоты в сыворотке крови с помощью фотоэлектроколориметра, *Лаб. дело*, **4**, 115–116.
29. Матюшина Б.Н., Логинов А.С., Ткачев В.Д. (1991) Определение супероксиддисмутазной активности в материале пункционной биопсии печени при ее хроническом поражении, *Лаб. дело*, **7**, 16–19.
30. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Т. (1988) Метод определения каталазы, *Лаб. дело*, **1**, 16–19.
31. Ллойд Э., Ледерман У. (1990) *Справочник по прикладной статистике*, Финансы и статистика, Москва.
32. Chistyakov, V.A., Prazdnova, E.V., Gutnikova, L.V., Sazykina, M.A., and Sazykin, I.S. (2012) Superoxide scavenging activity of plastoquinone derivative 10-(6'-plastoquinonyl)decyltriphenylphosphonium (SkQ1), *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 776–778.
33. Zinovkin, R.A., Romaschenko, V.P., Galkin, I.I., Zakharova, V.V., Pletjushkina, O.Yu., Chernyak, B.V., and Popova, E.N. (2014) Role of mitochondrial reactive oxygen species in age-related inflammatory activation of endothelium, *Aging*, **6**, 661–674.
34. Antonenko, Y.N., Roginsky, V.A., Pashkovskaya, A.A., Rokitskaya, T.I., Kotova, E.A., Zaspas, A.A., Chernyak, B.V., and Skulachev, V.P. (2008) Protective effects of mitochondria-targeted antioxidant SkQ in aqueous and lipid membrane environments, *J. Membr. Biol.*, **222**, 141–149.
35. Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., and Grodsky, G.M. (2009) Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes, *Endocr. Rev.*, **23**, 599–622.
36. Murakami, K., and Yoshino, M. (1997) Inactivation of aconitase in yeast exposed to oxidative stress, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **41**, 481–486.
37. Gardner, P.R., Nguyen, D.M., and White, C.W. (1994) Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **91**, 12248–12252.
38. Турпаев К.Т. (2002) Активные формы кислорода и экспрессия генов, *Биохимия*, **67**, 339–352.
39. Дубинина Е.Е. (1995) Характеристика внеклеточной супероксиддисмутазы, *Вопр. мед. хим.*, **41**, 8–12.
40. Попова Т.Н., Агарков А.А., Веревкин А.Н. (2013) Интенсивность свободнорадикальных процессов в печени крыс при сахарном диабете 2 типа и введении эпифамина, *Acta Naturae*, **5**, 129–134.

EFFECTS OF 10-(6'-PLASTOQUINOL)- DECYLTRIPHENYLPHOSPHONIUM (SkQ1) ON OXIDATIVE STATUS AT RATS WITH HYPERGLYCEMIA INDUCED BY ADMINISTRATION OF PROTAMINESULFATE

Y. G. Voronkova¹, T. N. Popova^{1*}, A. A. Agarkov¹, M. V. Skulachev²

¹ Voronezh State University, Faculty of Medical Biochemistry and Microbiology, Universitetskaya pl. 1, Voronezh 394006, Russia; E-mail: tpopova@bio.vsu.ru

² Institute of Mitoengineering, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia; E-mail: info@skq-project.ru

Received April 7, 2015

Revision received July 23, 2015

The influence of SkQ1 on oxidative status and activity of some antioxidant enzymes in rat liver and serum under experimental hyperglycemia induced by introduction of protamine sulfate were investigated. SkQ1 decreased protaminesulfate-induced hyperglycemia in the rats. Introduction of the substance under pathology was accompanied by changes in biochemiluminescence parameters reflecting the intensity of free radical processes, the primary lipid peroxidation product level (diene conjugates), aconitase hydratase activity, and citrate content in rat liver and serum toward control values. Superoxide dismutase and catalase activity, increasing under hyperglycemia, decreased on exposure to SkQ1 under the pathology. This may be related with the ability of SkQ1 to normalize free radical homeostasis, an imbalance that is observed under hyperglycemia.

Key words: hyperglycemia, SkQ1, free radical oxidation, biochemiluminescence, superoxide dismutase, catalase, aconitase hydratase, citrate