

ДІЯ КВЕРЦЕТИНУ ТА ВІТАМІНУ С НА ЦИТОХРОМ P450 2E1 ПРИ МЕТАБОЛІЧНОМУ СИНДРОМІ У МОРСЬКИХ СВИНОК.

Рушчак В.В., Коваленко В.М.*, Шаяхметова Г.М.*, Кітам В.О., Чащин М.О.

*Інститут молекулярної біології та генетики, Національна академія наук України, *Інститут фармакології та токсикології, Національна академія медичних наук України*

Рушчак В.В., Коваленко В.М., Шаяхметова Г.М., Кітам В. О., Чащин М.О. Дія кверцетину та вітаміну С на цитохром P450 2E1 при метаболічному синдромі у морських свинок // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 3. – С. 90-93.

Патогенез метаболічного синдрому (МС) та цукрового діабету (ЦД) обумовлений розвитком інсулінорезистентності, гіперглікемії та структурно-функціональними порушеннями клітин підшлункової залози. В даній роботі, використовуючи модель МС – попередника ЦД 2 типу, було проведено дослідження впливу інгібітору цитохрому P450 2E1 на біохімічні та гістологічні показники організму тварин з МС. Розвиток МС викликали шляхом 28-денного внутрішньом'язового введення 15 мг/кг протамін сульфату морським свинкам. У тварин спостерігали основні симптоми МС: підвищення рівня глюкози та холестерину в крові, зменшення вмісту глікогену в печінці, структурно-функціональні пошкодження та зменшення кількості функціонально активних β -клітин в підшлунковій залозі. Дія кверцетину та його комбінації з вітаміном С призводила до покращення біохімічних показників крові та збільшення числа функціонально активних β -клітин підшлункової залози.

Ключові слова: метаболічний синдром, цитохром P450, кверцетин, діабет.

Рушчак В.В., Коваленко В.Н., Шаяхметова А.М., Кітам В.О., Чащин Н.А. Действие кверцетина и витамина С на цитохром P450 2E1 при метаболіческом синдроме у морских свинок // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 3. – С. 90-93.

Патогенез метаболічного синдрому (МС) и сахарного диабета (СД) обусловлен развитием инсулинорезистентности, гипергликемии и структурно-функциональными нарушениями клеток поджелудочной железы. В данной работе, используя модель МС - предшественника СД 2 типа, было проведено исследование влияния ингибитора цитохрома P450 2E1 на биохимические и гистологические показатели организма животных с МС. Развитие МС вызывали путем 28-дневного внутримышечного введения 15 мг / кг протамин сульфата морским свинкам. У животных наблюдали основные симптомы МС: повышение уровня глюкозы и холестерина в крови, уменьшение содержания гликогена в печени, структурно-функциональные повреждения и уменьшение количества функционально активных β -клеток в поджелудочной железе. Действие кверцетина и его комбинации с витамином С приводило к улучшению биохимических показателей крови и увеличению числа функционально активных β -клеток поджелудочной железы.

Ключевые слова: метаболіческий синдром, цитохром P450, кверцетин, диабет.

Rushchak V.V., Kovalenko V.M., Shayakhmetova G.M., Kitam V.O., Chashchyn M.O. Effect of quercetin and vitamin C on cytochrome P450 2E1 in guinea pigs with the metabolic syndrome // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 3. – С. 90-93.

The pathogenesis of the metabolic syndrome (MS) and diabetes mellitus (DM) is caused by the development of insulin resistance, hyperglycemia and structural-functional disorders in the pancreas cells. In this work we conducted research considering the influence of the cytochrome P450 2E1 inhibitor on biochemical and histological parameters of animals with MS, as a precursor of type 2.

The MS development was caused by 28-day intramuscular injection of 15 mg / kg protamine sulfate to guinea pigs. The main MS symptoms were observed in animals: increased glucose and cholesterol levels, decreased glycogen in the liver, structural and functional damages and reduced number of functionally active β -cells in the pancreas. Administration of quercetin and its combination with vitamin C led to the improved biochemical indicators of blood and increased number of functionally active β -cells in pancreas.

Keywords: metabolic syndrome, cytochrome P450, quercetin, diabetes.

Вступ. Цукровий діабет (ЦД) є наслідком розладу процесів обміну речовин в організмі. Основним його симптомом є гіперглікемія викликана порушенням метаболізму глюкози. На сьогодні розрізняють декілька різновидів даної патології. Цукровий діабет 1 типу зумовлюється дисфункцією β -клітин підшлункової залози, що призводить до зниження або відсутності продукції ними інсуліну [10]. Цукровий діабет 2 типу (ЦД 2) виникає внаслідок хронічного порушення обміну речовин, що зумовлює постійну гіперглікемію, яка в свою чергу спричиняє розвиток інсулінорезистентності [8]. Значно рідше зустрічаються специфічні типи діабету та геста-

ційний цукровий діабет або діабет вагітних [5].

Різке зростання частоти захворювання, тяжкі ускладнення та висока летальність, особливо серед працездатного населення, призвели останнім часом до того, що ЦД увійшов до тріади найпоширеніших сучасних хвороб (після серцево-судинних та онкологічних захворювань). Отже, дослідження патогенезу ЦД має надзвичайну важливість для профілактики, ранньої діагностики та лікування цього захворювання.

Розвиток цукрового діабету тісно пов'язаний із підвищенням рівня експресії однієї з ізоформ цитохрому P450 – цитохрому P450 2E1 (CYP2E1), яка ще має назву інсулінозалежної. Високий рівень експресії

CYP2E1 при цукровому діабеті обумовлюється як недостатністю інсуліну – природного інгібітору цитохрому P450 2E1, так і надлишком кетонів тіл, які є для нього субстратом [11]. З одного боку, індукований CYP2E1 при діабеті відіграє важливу роль у біотрансформації кетонів тіл та зменшенні проявів пкідливого для організму кетозу крові. З іншого – збільшення рівня експресії CYP2E1 призводить до підвищення його оксидативної активності та розвитку оксидативного стресу [11], який зумовлює виникнення різноманітних ускладнень. Надмірна активація оксидативних процесів веде до порушення ліпідного та вуглеводного обмінів та розвитку численних структурно-функціональних змін на клітинному рівні [7, 12, 13]. Експериментально показано високу ефективність антиоксидантної терапії при лікуванні цукрового діабету 2 типу [3,15,19].

Виходячи з вищевказаного, регуляція рівня експресії CYP2E1 в поєднанні з контролем стану антиоксидантної системи може виявитись надзвичайно ефективними при ранньому лікуванні та профілактиці ускладнень цукрового діабету. Саме тому метою нашої роботи було дослідження впливу високоефективного інгібітору CYP2E1 – кверцетину та відомого антиоксиданту – вітаміну С на розвиток патологічних процесів при МС.

Матеріали і методи. Вся робота з експериментальними тваринами проводилась відповідно до норм Європейської конвенції із захисту хребетних тварин при їх використанні в експериментах та інших наукових цілях [2]. В роботі було використано 4-місячних самців морських свинок вагою 350-400 г.

Використана тваринна модель метаболічного синдрому базується на моделі інсулінорезистентності та гіперглікемії, індукованих тривалим введенням дослідним тваринам протамін-сульфату [9]. Протамін-сульфат зв'язує ендogenous гепарин, який є необхідним для нормальної фізіологічної дії інсуліну [16, 17]. Серед інших фізіологічних ефектів протаміну відмічено зниження системного артеріального тиску, збільшення тиску в легеневій артерії та опору легеневих судин [14].

Розвиток МС викликали шляхом внутрішньом'язового введення тваринам 15 мг/кг протамін-сульфату протягом 28 діб. Найвнішею симптомів визначали через добу після останнього введення протамін-сульфату (група 1). Решту дослідних тварин поділили на три групи та утримували ще 14 днів за різних умов. Другу групу тварин утримували за стандартних умов з метою контролю стійкості симптомів. Третій та четвертій групі протягом цього ж часу вводили інгібітор активності CYP2E1 (кверцетин) у дозі 5мг/кг та його комбінацію з вітаміном С (20мг/кг), відповідно. Як контроль використовували інтактних морських свинок відповідних ваги та віку.

В сироватці крові за допомогою автоматичного біохімічного аналізатора (Prestige 24i, Токуо Вокі, Японія) проводили біохімічне визначення наступних показників: вміст загального білірубіну, холестерину, глюкози, активність аланін амінотрансферази (АЛАТ) та аспартат амінотрансферази (АсАТ). Гістологічне дослідження тканин

печінки та підшлункової залози проводили згідно загальноприйнятих методик [4].

Зміни вмісту білка CYP2E1 у тканинах печінки визначали відносно білка GAPD (контроль) методом Вестерн-блот аналізу. Специфічні поміклональні антитіла до CYP2E1 та GAPD було отримано в ІМБіГ НАНУ. Візуалізацію білкових смуг проводили хемілюмінесцентним методом згідно протоколу ECL Western Blotting (“Amersham”, Англія). Результати Вестерн-блот аналізу представлено у відносних одиницях, які вираховували як відношення вмісту білка CYP2E1 до вмісту контрольного білка GAPD на тій самій доріжці гелю.

При статистичній обробці результатів дослідження використовували пакет статистичних програм STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc. 2004, США). Значення $p \leq 0,05$ розглядали як критерій значущості різниці.

Результати та обговорення. Результати біохімічного аналізу сироватки крові (Таблиця) показують, що на 28 день введення протамін-сульфату у дослідних тварин (група 1) з'являються ознаки гіперглікемічного стану – підвищення в сироватці крові рівня глюкози та холестерину на 15% та 40%, відповідно. Показано також зростання, відносно контролю, індекса де Рітиса (співвідношення АсАТ до АЛАТ) до значення 1,5, що є характерною ознакою розвитку запальних процесів в печінці [1]. Про підвищений рівень інсуліну може свідчити зростання кількості холестерину, синтез якого індукується даним гормоном [8]. Через два тижні в групі контролю стійкості симптомів захворювання – група 2 спостерігали подальше зростання рівня глюкози та індексу де Рітиса (Таблиця). Зниження рівня холестерину в цій групі до контрольних значень може вказувати як на зниження синтезу інсуліну, так і на розвиток інсулінорезистентності. Зменшення рівня загального білірубіну в сироватці крові дослідних тварин групи 2 більш ніж втричі відносно групи 1 може свідчити про надлишок вільних радикалів в сироватці крові дослідних тварин [20].

Введення інгібітору CYP2E1 сприяло нормалізації біохімічних параметрів сироватки крові та приводило до зменшення рівня глюкози. Одночасна дія інгібітору та вітаміну С викликала інтенсифікацію процесу відновлення. Зокрема, рівень глюкози знижувався на 25% відносно такого у діабетичних тварин, а рівень загального білірубіну та індекс де Рітиса наближалися до норми.

Можна припустити, що на 4 тижень моделювання захворювання значення глікемії зберігаються відносно невисокими внаслідок компенсаторної гіперінсулінемії, аналогічним чином як це спостерігається на початку розвитку цукрового діабету 2 типу. Утримання тварин на високовуглеводній дієті та зниження чутливості до інсуліну стимулює посилену секрецію інсуліну, що врешті веде до виснаження бета-клітин підшлункової залози та зменшення кількості ендogenous інсуліну. Це проявляється в зростаючих значеннях глікемії на 6 тижень моделювання захворювання.

Таблиця. Показники біохімічного аналізу сироватки крові тварин.

Група тварин	Загальний білірубін, мкмоль/л	Холестерин, ммоль/л	Глюкоза, ммоль/л	АлАТ, нмоль/(с*л)	АсАТ, нмоль/(с*л)
Контроль.	0,53±0,02	1,05±0,05	6,8±0,3	607,61±9,0	686,50±7,8
Група 1. Через добу після останнього введення протамін-сульфату	0,63±0,03*	1,44±0,07*	7,66±0,4	696,94±8,3*	1049,44±8,1*
Група 2. Через 14 днів після останнього введення протамін-сульфату	0,17±0,01*	0,99±0,045	12,65±0,6*	606,25±11,0	1390,25±12,0*
Група 3. 14 днів введення кверцетину	0,27±0,01*	1,72±0,08*	10,08±0,5*	538,72±9,6*	735,25±7,9*
Група 4. 14 днів введення комбінації кверцетину та вітаміну С	0,30±0,015*	1,40±0,07*	9,35±0,45*	560,2±11,4*	813,25±11,8*

* – Достовірна різниця у порівнянні з інтактними тваринами, $p \leq 0,05$, $n = 5$

В ході розвитку МС спостерігалось підвищення рівня СУР2Е1 у дослідних тварин майже в півтора рази (Рис.1). Таким рівень СУР2Е1 залишався і при дії інгібітору та його комплексу з вітаміном С. Це може бути спричинено як високим рівнем кетонів тіл (субстрати СУР2Е1), так і розвитком інсулінорезистентності та відсутності інгібуючої ролі інсуліну на експресію цього білку. Отримані дані свідчать, що інгібітор СУР2Е1 – кверцетин, який використовували у дослідженні не впливає на рівень цього білку, а лише на його активність.

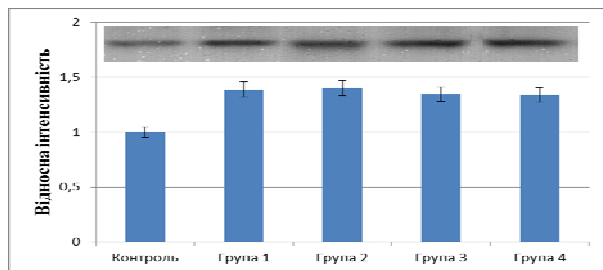


Рис. 1. Вміст білка СУР2Е1 в печінці. Група 1 - Через добу після останнього введення протамін-сульфату. Група 2 - Через 14 днів після останнього введення протамін-сульфату. Група 3 - 14 днів введення кверцетину. Група 4 - 14 днів введення комбінації кверцетину та вітаміну С.

Як було зазначено вище, при розвитку цукрового діабету патологічні процеси найбільш активно проявляються у клітинах печінки та підшлунковій залозі. З метою оцінки функціонального стану даних органів було проведено гістологічне дослідження їх тканин, яке включало морфологічне вивчення та дві специфічні гістохімічні реакції (фарбування альдегід-фуксином та PAS-реакція). Було показано, що у тварин групи контролю стійкості захворювання (група 2) морфофункціональні зміни були значно більш виражені, ніж в групі 1. Саме тому проводилось порівняння результатів гістологічного дослідження органів тварин групи 2 та тварин, яким вводився інгібітор СУР2Е1 та його комбінація з вітаміном С (в останніх двох групах відмічено подібні результати гістологічного дослідження). Так, гепатоцити контрольних тварин (Рис.2а) багаті на ацидофільну цитоплазму та мають багатогранну форму з чітко означеними межами. Центральна зона клітин зайнята круглими ядрами з 1-2 ядерцями різних розмірів. Розвиток діабету у дослідних тварин (Рис.2б) супроводжувався появою у цитоплазмі гепатоцитів

невеликих вакуолей. Ядра клітин, що оточують судини, мають неправильну форму. Такі гістологічні зміни вказують на запальний процес в печінці. Дія інгібітору СУР2Е1, особливо в комплексі з вітаміном С приводила до зменшення пошкодження печінки, а структура гепатоцитів наближалась до контрольної (Рис 2 в).

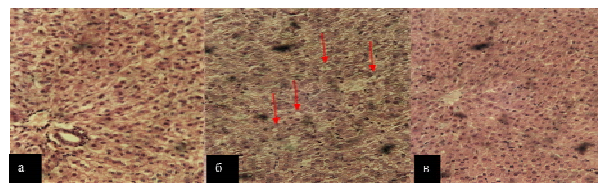


Рис. 2. Мікрофотографії тканин печінки тварин (фарбування гематоксилином-еозином): а – інтактні тварини; б – тварини групи контролю стійкості захворювання (група 2); в – тварини, яким вводилась комбінація інгібітору СУР2Е1 та вітаміну С (група 4). Стрілками вказаний мікроевезикулярний стеатоз. Н&Е, x290.

Фарбування препаратів підшлункової залози альдегід-фуксином показало, що β -клітини контрольних тварин (Рис.3а) щільно заповнені дрібними секреторними гранулами та інтенсивно забарвлюються в червоний колір, що вказує на нормальний функціональний стан клітин. У тварин групи 2 (Рис.3б) інсулін-продукуючі острівці невеликих розмірів, в них зменшується кількість β -клітин, а цитоплазма деяких інсулоцитів взагалі не забарвлюється. Означені морфологічні зміни свідчать про послаблення ендокринної функції тканини підшлункової залози. В групі 4 (рис.3в) спостерігається покращення стану підшлункової залози, в панкреатичних острівцях збільшується кількість інсулоцитів, зустрічаються поодинокі β -клітини між острівцями, хоча зустрічаються поодинокі інсулоцити, цитоплазма яких не забарвлюється альдегід-фуксином.

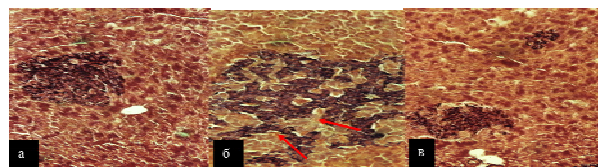


Рис. 3. Мікрофотографії тканин підшлункової залози (фарбування альдегід-фуксином). а – інтактні тварини; б – тварини групи контролю стійкості захворювання (група 2); в – тварини, яким вводилась комбінація кверцетину та вітаміну С (група 4). Стрілками вказані дистрофічні зміни острівців Лангерганса. Н&Е, x290.

Результати PAS-реакції, яка показує вміст глікогену в гепатоцитах, свідчать про зниження рівня глікогену в клітинах печінки при розвитку МС (Рис. 4б). Це може бути зумовлено зниженням чутливості тканин печінки до дії інсуліну та активацією процесів перетворення глікогену в глюкозу [6]. Останнє в свою чергу веде до гіперглікемії та посилення продукції інсуліну, що в результаті призводить до виснаження інсулін-продукуючого апарату та розвитку діабету. Дія інгібітору (Рис.4в) не призводить до збільшення вмісту глікогену, рівень якого залишається низьким.

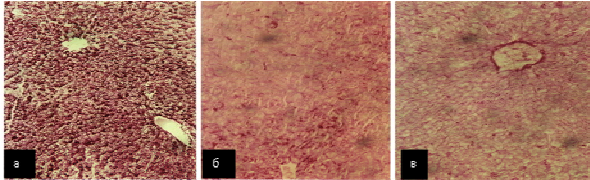


Рис. 4. Мікрофотографії тканин печінки, (PAS-реакція на вміст глікогену). а – інтактні тварини; б – тварини групи контролю стійкості захворювання; в – тварини, яким вводилась комбінація кверцетину та вітаміну С. Н&Е, x180.

Таким чином ми спостерігали значне покращення структурно функціонального стану підшлункової залози та печінки дослідних тварин із МС при одночасній дії інгібітору СYP2E1 та вітаміну С.

Висновок: Розвиток патологічних процесів при МС супроводжується підвищенням рівня цитохрому P450 2E1. Використання вискоєфективного інгібітору СYP2E1 – кверцетину у поєднанні з антиоксидантною терапією (вітамін С) дозволяє значно зменшити патологічні процеси в організмі тварин з метаболічним синдромом. Під впливом кверцетину спостерігається відновлення тканин підшлункової залози та печінки експериментальних тварин з МС.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Бабак О. Я., Колесникова Е. В., Кравченко Н. А. Фиброз печени: современные представления о механизмах, способах диагностики и лечения. *Сучасна гастроентерологія*, 2009. № 2., с. 5–17.
2. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментів або в інших наукових цілях, САСЕ №: 123, дійсний від 01.01.1991
3. Занозина О. В., Боровков Н. Н., Балаболкин М. И. Необходимость и достаточность использования антиоксидантов в терапии больных сахарным диабетом 2 типа. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2006, прил. 1, с. 112–118.
4. Коржевский Д. Э., Гиляров А. В. Основы гистологической техники. "СпецЛит", 2010, 94 с.
5. Кузишин О. В., Ковалишин Н. В., Алмашина Х.В. Біохемія цукрового діабету: 1. Теоретична частина (огляд); *Медична хімія*, 2010, с. 74–115.
6. Михайлов В. В. Основы патологической физиологии: руководство для врачей. –М., Медицина, 2001.–704 с.
7. Подільчак М. Д., Вдовиченко В. І., Терлецька Л. М. Перекисне окислення ліпідів і пероксидазна активність сироватки крові при захворюваннях гепатобіліарної системи. *Лікувальна справа*, 1996. № 1-2. с. 110-112.
8. Рунихин А. Ю., Новикова Ю. В. Современные аспекты патогенеза и лечения сахарного диабета 2 типа; *Эндокринология*, 2007 г, том 15, № 27
9. Ульянов А.М., Тарасов Ю.А. Инсулярная система животных при хроническом дефиците гепарина; *Вопросы мед. химии*. 2000. Т. 46, № 2. С. 149-154.
10. Чазова Т.Е. Основные принципы лечения сахарного диабета 1 типа / Т.Е. Чазова // *Русский медицинский журнал*. 2003. - т.11, №27. -С. 15-20.
11. Ahn, T., Yun, C. H., Oh, D. B., 2006. Tissue-specific effect of ascorbic acid supplementation on the expression of cytochrome P450 2E1 and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Toxicology Letters*, №166, pp. 27–36.
12. Dean–Roger T., Fu Schanlin, Stroker R.D.M. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation // *Biochem.j*.1997. 324, № 1. pp. 1-18.
13. Folli F, Corradi D, et al., The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus micro- and macrovascular complications: avenues for a mechanistic-based therapeutic approach. *Current Diabetes Review* 2011; №7 (5), pp. 313-34.
14. Horrow, J. C. Protamine: A Review of its Toxicity; *Review Article.*, *Anesthesia and analgesia*, 1985, № 64, pp. 348-361.
15. Ischenko I. A., Milenkaya T. M. Efficacy of antioxidant usage in the treatment of diabetic retinopathy, *Clinical ophthalmology*, 2007, том 8, №3.
16. Kudriashov B. A, Shapiro B. F., Ulianov AM, Protamine sulfate-induced resistance to the hypoglycemic effect of insulin; *Probl Endokrinol (Mosk)*. 1984 Jan-Feb;30 (1); 51 p.
17. Kudrjashov B. A., Shapiro F. B., Ulyanov A. M., Role of heparin in realization of the hypoglycaemic action of insulin., *Acta Physiologica Hungarica*. 1987;69(2), pp. 197-202.
18. Roep B. O., Atkinson M. Animal models have little to teach us about Type 1 diabetes: 1. In support of this proposal, *Diabetologia* (2004)
19. Scott, J. A., King, G. L., 2004. Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetes. *Annual New York Academical Science* 1031, 204–213.
20. Yamaguchi T, Terakado M., Horio F. et al. Role of bilirubin as an antioxidant in an ischemia–reperfusion of rat liver and induction of gene oxygenase. *Biochem. Biophys. Res Commun*, 1996, №223, pp.129-135

Надійшла 12.06.2012 р.

Рецензент: проф. С.М.Смірнов