

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ И СИСТЕМА ГЛУТАТИОНА В АДИПОЦИТАХ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Иванов В.В., Носарева О.Л.,
Рязанцева Н.В., Новицкий В.В.

Сибирский государственный медицинский институт, г. Томск

РЕЗЮМЕ

В настоящее время в структуре заболеваний сахарный диабет (СД) занимает третье место после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний и является главной причиной слепоты, значительно повышает риск развития инфаркта миокарда, ишемической болезни сердца, нефропатий, гипертонии у пациентов с данной патологией, в связи с чем актуальны клинические и экспериментальные исследования, направленные на изучение механизмов возникновения и развития СД.

Целью исследования являлось изучение состояния окислительной модификации белков и глутатион-зависимой системы антиоксидантной защиты в адипоцитах и плазме крови крыс с аллоксановым диабетом в условиях окислительного стресса.

Материал и методы. У крыс индуцировали развитие СД 1-го типа введением аллоксана (90 мг/кг массы тела). Плазму крови и адипоциты получали из эпидидимальной жировой ткани крыс, определяли содержание карбонильных производных белков, окисленного триптофана, битирозина, общего, восстановленного, окисленного и белковосвязанного глутатиона, активность глутатионпероксидазы.

Результаты. В адипоцитах и плазме крови крыс с аллоксановым диабетом увеличивалась концентрация карбонильных производных белков, битирозина и окисленного триптофана на фоне снижения редокс-потенциала системы глутатиона и активности глутатионпероксидазы.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют об активации свободнорадикального окисления белков и снижении антиоксидантной защиты в условиях окислительного стресса в жировой ткани крыс с аллоксановым диабетом, что играет важную роль в патогенезе СД и развитии его осложнений.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сахарный диабет, адипоциты, окислительный стресс, карбонильные производные белков, окисленный триптофан, битирозин, глутатион.

Введение

В России в 2010 г. насчитывалось 3,2 млн больных сахарным диабетом (СД). Учитывая динамику заболеваемости и смертности за последние 10 лет, к 2030 г. число зарегистрированных больных СД может возрасти до 5,8 млн человек [1]. Диабет является главной причиной слепоты, значительно повышает риск развития инфаркта миокарда, ишемической болезни сердца, нефропатий, гипертонии [2–5].

Развитие различных патологий, в частности сахарного диабета, сопровождается нарушением процессов редокс-регуляции в клетках и формировани-

ем окислительного стресса [2, 4, 6]. Активные формы кислорода (АФК) оказывают регулирующее влияние на клетки, участвуя в качестве вторичных мессенджеров в передаче опосредованного лиганд-рецепторными взаимодействиями сигнала, в том числе, в трансдукции инсулинового сигнала [2, 7]. В то же время нарушение баланса между про- и антиоксидантами, гипергликемия и высокий уровень свободных жирных кислот при СД приводят к накоплению АФК, способствующих окислительному повреждению макромолекул (липидов, белков и нуклеиновых кислот), что лежит в основе патогенеза СД и развития осложнений [2, 3, 5, 8].

Глутатион в комплексе с глутатионпероксидазой и глутатионредуктазой образует систему, обладаю-

✉ Шахристова Евгения Викторовна, тел. 8-903-913-02-93;
e-mail: shaxristova@yandex.ru

щую антиоксидантную активность, играет важную роль в регуляции метаболических процессов в клетках, в том числе в адипоцитах. Эпидидимальная жировая ткань характеризуется высоким содержанием общего глутатиона, но низким редокс-статусом и повышенной чувствительностью системы глутатиона к окислительному стрессу [9]. В настоящее время недостаточно изучены процессы свободнорадикального окисления макромолекул и состояние системы антиоксидантной защиты в жировой ткани при СД.

Цель исследования – изучить окислительную модификацию белков и глутатион-зависимую систему антиоксидантной защиты в адипоцитах эпидидимальной жировой ткани и плазме крови крыс при развитии аллоксанового диабета.

Материал и методы

Исследования проводили на 24 крысах-самцах линии Wistar массой тела (210 ± 25) г, которые были получены из ОАО «Питомник „Рассвет“» (г. Томск). Эксперименты проводились согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 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. Протокол исследований был одобрен этическим комитетом Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск) на заседании от 30.09.2013 г.

Методом случайной выборки животные были распределены на две группы: 12 крыс образовали контрольную и 12 – опытную. В опытной группе экспериментальный диабет у крыс вызывали четырехкратной внутривентрикулярной инъекцией аллоксана (Sigma Aldrich, США) в дозе 90 мг/кг массы тела. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор с той же частотой и дозировкой, что и в опытной группе. Через 2 нед после введения аллоксана животных усыпляли CO_2 -асфиксией. Получали плазму крови, адипоциты выделяли из эпидидимальной жировой ткани по методу M. Rodbell [10] с использованием коллагеназы (Sigma Aldrich, США). Концентрацию адипоцитов в суспензии стандартизировали с помощью разведения буфером до 1×10^6 клеток в 1 мл. Жизнеспособность выделенных клеток оценивали микроскопическим методом с трипановым синим (Serva, США). Доля живых клеток составляла не менее 95%.

Интенсивность окислительной модификации протеинов в плазме крови и адипоцитах эпидидимальной

жировой ткани оценивали по содержанию карбонильных производных белков при спонтанных и металл-катализируемых процессах методом, основанным на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, которые регистрировали спектрофотометрически [11]. Определение содержания окисленного триптофана (по снижению флюоресценции его восстановленной формы) и образование битирозиновых сшивок проводили методом, описанным K.J. Davies [12].

Состояние антиоксидантной защиты в плазме крови и адипоцитах оценивали по содержанию общего, восстановленного и окисленного глутатиона, определяемого циклическим методом M.E. Anderson [13], и активности глутатионпероксидазы – по интенсивности окисления НАДФН₂ [14]. Определение содержания белковосвязанного глутатиона основано на способности боргидрата натрия высвободить глутатион из связи с белками, содержание белковосвязанного глутатиона затем измеряли спектрофотометрически [15].

Проверку на соответствие выборок данных нормальному закону распределения проводили критерием Шапиро–Уилка. В связи с отсутствием согласия данных с нормальным распределением на уровне значимости $p < 0,05$ вычисляли средневыворочные характеристики: медиану Me , первый и третий квартили (Q_1 – Q_3). Уровень статистической значимости различий выборок оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при достигнутом уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Развитие СД 1-го типа при введении аллоксана сопровождалось активацией свободнорадикального окисления белков и аминокислот в плазме крови, что выражалось в увеличении концентрации битирозина, окисленного триптофана, карбонильных производных белков при спонтанных и металл-катализируемых процессах (табл. 1) на фоне снижения антиоксидантного потенциала системы глутатиона (табл. 2). В плазме крови крыс с экспериментальным диабетом развивался окислительный стресс и снижалась антиоксидантная защита, о чем свидетельствуют результаты собственных исследований и данные литературы, полученные на экспериментальных моделях диабета 1-го и 2-го типа и в клинических наблюдениях [4, 5]. Однако остаются малоизученными в адипоцитах при аллоксановом диабете процессы свободнорадикального окисления и состояние антиоксидантной защиты.

Таблица 1

Показатели окислительной модификации белков и аминокислот в плазме крови крыс с аллоксановым диабетом (Ме (Q ₁ -Q ₃))					
Показатель		Плазма крови		Адипоциты	
		Контроль (n = 12)	Аллоксановый диабет (n = 12)	Контроль (n = 12)	Аллоксановый диабет (n = 12)
Карбонильные производные белков, усл. ед./мг белка: спонтанная окислительная модификация белков	λ = 274 нм	4,66 (4,28–5,55)	27,01 (24,09–27,88) <i>p</i> < 0,01	11,39 (10,87–13,10)	35,32 (31,30–37,10) <i>p</i> < 0,01
	λ = 363 нм	8,36 (8,07–8,56)	31,78 (31,02–31,99) <i>p</i> < 0,01	23,06 (21,18–23,42)	53,94 (50,42–58,70) <i>p</i> < 0,01
металл-катализируемая окислительная модификация белков	λ = 274 нм	16,83 (14,89–16,98)	41,84 (41,39–46,26) <i>p</i> < 0,01	131,96 (109,78–137,99)	241,25 (228,90–263,78) <i>p</i> < 0,01
	λ = 363 нм	22,65 (21,70–23,77)	48,22 (45,94–48,48) <i>p</i> < 0,01	192,90 (191,75–195,01)	279,30 (263,82–334,30) <i>p</i> < 0,01
Битирозин, усл. ед./мг белка		0,13 (0,12–0,14)	0,19 (0,18–0,20) <i>p</i> < 0,01	2,28 (2,06–2,53)	3,43 (3,18–3,76) <i>p</i> < 0,01
Триптофан, усл. ед./мг белка		0,92 (0,90–0,95)	1,08 (1,04–1,12) <i>p</i> < 0,05	0,73 (0,70–0,76)	1,01 (0,81–1,17) <i>p</i> < 0,05

Примечание. Здесь и в табл. 2: *p* – уровень значимости различий, рассчитанный относительно контрольных величин.

Таблица 2

Содержание общего, восстановленного, окисленного глутатиона, белково-связанного глутатиона и активность глутатионпероксидазы в плазме крови и адипоцитах крыс с аллоксановым диабетом (Ме (Q ₁ -Q ₃))				
Показатель	Плазма крови		Адипоциты	
	Контроль (n = 12)	Аллоксановый диабет (n = 12)	Контроль (n = 12)	Аллоксановый диабет (n = 12)
GSH + GSSG, нмоль/мг белка	0,067 (0,065–0,082)	0,046 (0,041–0,048) <i>p</i> < 0,01	19,61 (19,02–19,86)	15,75 (14,68–15,89) <i>p</i> < 0,01
GSH, нмоль/мг белка	0,060 (0,059–0,076)	0,040 (0,035–0,043) <i>p</i> < 0,01	17,01 (16,42–17,33)	13,28 (12,10–13,66) <i>p</i> < 0,01
GSSG, нмоль/мг белка	0,006 (0,005–0,007)	0,005 (0,005–0,006)	2,43 (2,31–2,53)	2,55 (2,54–2,71)
GSH/GSSG	9,7 (8,2–13,4)	7,1 (6,1–8,3) <i>p</i> < 0,05	7,30 (6,90–7,60)	5,20 (4,75–5,30) <i>p</i> < 0,05
ГПО, нмоль НАДФН/(мин · мг белка)	108,9 (101,2–142,4)	56,4 (54,9–67,4) <i>p</i> < 0,01	241,1 (219,6–284,1)	131,8 (85,7–187,6) <i>p</i> < 0,01
Белок-SSG, нмоль/мг белка	0,005 (0,004–0,005)	0,007 (0,005–0,008) <i>p</i> < 0,05	1,68 (1,45–1,93)	2,22 (2,05–2,42) <i>p</i> < 0,05

Примечание. GSH + GSSG – общий глутатион; GSH – восстановленный и GSSG – окисленный глутатион; белок-SSG – белково-связанный глутатион; ГПО – активность глутатионпероксидазы.

Проведенная нами оценка интенсивности процессов окислительной модификации протеинов в адипоцитах крыс с аллоксановым диабетом показала увеличение содержания карбонильных производных белков (табл. 1). Альдегидфенилгидразоны, регистрируемые при длине волны 274 нм, являются ранними маркерами окислительной деструкции белка и свидетельствуют о начальном этапе повреждений белковых молекул. По результатам проведенных исследований, их содержание в адипоцитах крыс с аллоксановым диабетом увеличивалось в 5,8 раза по сравнению со значениями показателя в группе контроля (табл. 1). При спонтанной окислительной модификации белков кетондинитрофенилгидразоны, определяемые при длине волны 363 нм, рассматриваются как поздние маркеры окислительной деструкции белка. В адипоцитах крыс

с аллоксановым диабетом содержание кетондинитрофенилгидразонов в 3,8 раза превышало контрольные значения (табл. 1), что свидетельствует о значительной подверженности молекул белков адипоцитов окислительным повреждениям при СД.

Важным источником карбонильных соединений в клетках является металл-катализируемое окисление (МКО) белков. МКО белков представляет собой сайт-специфический процесс, в который вовлекаются пероксид водорода и металлы переменной валентности (железо, медь) в области металл-связывающей поверхности белка [16]. Действие компонентов системы Фентона при МКО белков связывают в основном с генерацией OH⁻, однако не исключена возможность образования и других реакционных соединений, в ча-

стности феррил- и перферрил-ионов (FeO^{2+} , FeOH^{3+}). В целом металл-катализируемое окисление белков приводит к дезаминированию отдельных аминокислотных остатков белков, превращению их в карбонильные производные, потере белком каталитической активности и увеличению чувствительности к протеолитической деградации [17]. Увеличение содержания кетондинитрофенилгидразонов в адипоцитах крыс с аллоксановым диабетом в 2,1 раза по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе при МКО белков (см. табл. 1) свидетельствует об истощении резервных возможностей клеток.

В условиях окислительного стресса и неконтролируемой генерации АФК преобладающими становятся процессы окислительной модификации белков, приводящие в конечном счете к утрате их биологической (ферментативной, рецепторной, транспортной и т.д.) активности. Окислительная модификация белков способствует появлению новых антигенов и провоцирует иммунный ответ, что играет важную роль в патогенезе и развитии осложнений при СД 1-го типа [2, 4].

Согласно современным представлениям, модификации могут подвергаться все остатки аминокислот в белках, но наиболее чувствительными являются остатки триптофана, тирозина, гистидина и цистеина [17]. АФК атакуют функциональные группы аминокислот в составе белков, что приводит к образованию первичных аминокислотных радикалов, которые могут вступать во вторичные взаимодействия с соседними аминокислотными остатками. В целом создается сложная картина повреждающего действия АФК на белковые макромолекулы [2, 3]. Образующиеся при окислении тирозина радикалы могут взаимодействовать между собой, формируя битирозиновые межмолекулярные сшивки в белках. Битирозин стабилен в присутствии различных протеаз, устойчив при кислотном гидролизе, что создает предпосылки для его накопления в организме и участия в патологических процессах. Наличие битирозиновых производных считается надежным маркером АФК-индуцированных повреждений белков [2, 3]. В адипоцитах крыс с аллоксановым

диабетом было выявлено увеличение (в 1,5 раза) содержания битирозина по сравнению с его уровнем в контрольной группе (см. табл. 1). Окисление триптофана сопряжено с образованием ковалентных сшивок, приводящих к агрегации белков [2]. В адипоцитах крыс с экспериментальным диабетом концентрация окисленного триптофана возрастала в 1,4 раза по сравнению со значениями этого показателя в группе контрольных животных (см. табл. 1).

Повышение концентрации продуктов окислительной модификации белков и аминокислот обусловлено, с одной стороны, гиперпродукцией АФК, а с другой стороны, снижением активности систем антиоксидантной защиты клеток. Продукты свободнорадикального окисления макромолекул медленно элиминируются из клеток, выступая в качестве источника свободных радикалов, истощая запасы внутриклеточных антиоксидантов – глутатиона, аскорбиновой кислоты и др. [7, 16, 18]. Так, в наших исследованиях в адипоцитах крыс с аллоксановым диабетом уменьшалась в 1,2 раза концентрация общего глутатиона и в 1,3 раза – восстановленной формы трипептида (см. табл. 2). Обращала на себя внимание тенденция к снижению концентрации окисленного глутатиона. При этом величина отношения восстановленной формы трипептида к окисленной существенно снижалась (см. табл. 2), что свидетельствует о сокращении редокс-потенциала системы глутатиона в жировой ткани крыс с аллоксановым диабетом.

Нами было установлено также снижение активности глутатионпероксидазы в адипоцитах крыс с индуцированным СД в 1,8 раза (см. табл. 2), что может быть обусловлено низкой экспрессией при аллоксановом диабете генов ферментов, участвующих в метаболизме глутатиона – глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и глутатион-S-трансферазы. Наряду с этим одной из причин снижения активности фермента может служить обнаруженный низкий уровень кофермента – восстановленного глутатиона, который в условиях окислительного стресса расходуется в глутатионпероксидазной реакции [18].

Окислению активными кислородными метаболитами подвергаются SH-группы белков. Свободные радикалы 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. Для защиты клеточных протеинов от повреждающего действия АФК SH-группы белков подвергаются обратимому S-глутатионилированию, необходимому для сохранения их функциональной активности. Так, было выявлено увеличение в 1,3 раза содержания белковосвязанного глутатиона (белок-SSG) в адипоцитах крыс с аллоксановым диабетом по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе животных (см. табл. 2). Эти данные свидетельствуют о высоких потребностях жировых клеток в восстановленном глутатионе, необходимом для защиты белков в адипоцитах от окислительных повреждений, и как

следствие – снижении в клетках жировой ткани содержания восстановленной формы трипептида в условиях окислительного стресса при аллоксановом диабете.

Заключение

Таким образом, обнаруженные нами накопление продуктов окислительной модификации белков и снижение редокс-потенциала системы глутатиона в адипоцитах в условиях окислительного стресса при экспериментальном диабете играют важную роль в модуляции внутриклеточной редокс-сигнализации, активности ферментов и отражают интенсивность свободно-радикального повреждения макромолекул, что способствует развитию осложнений сахарного диабета.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для ведущих научных школ (договор № 4184.2014.7-НШ).

Литература

1. Сунцов Ю.И., Болотская Л.Л., Маслова О.В., Казаков И.В. Эпидемиология сахарного диабета и прогноз его распространенности в Российской Федерации // Сахарный диабет. 2011. № 1. С. 15–18.
2. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты. СПб.: Мед. пресса, 2006. 400 с.
3. Луцак В.И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма // Биохимия. 2007. Т. 72, № 8. С. 995–1015.
4. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА, 2008. 284 с.
5. Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome // Clin. Invest. 2004. Dec. V. 114, № 12. P. 1752–1761. doi: 10.1172/JCI200421625.
6. Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Иванов В.В., Носарева О.Л., Дзюман А.Н., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. Свободнорадикальное окисление белков и липидов в адипоцитах в условиях окислительного стресса // Молекулярная медицина. 2014. № 1. С. 59–64.
7. Иванов В.В., Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Фёдорова Т.С., Новицкий В.В. Адипоцит. Сахарный диабет. Окислительный стресс. Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2013. 112 с.
8. Иванов В.В., Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Жаворонков Т.В., Новицкий В.В. Влияние аллоксана на спонтанный липолиз и систему глутатиона в изолированных адипоцитах крыс // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2011. Т. 151, № 3. С. 288–291.
9. Иванов В.В., Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Жаворонков Т.В., Новицкий В.В. Перекисное окисление липидов и система глутатиона в жировой ткани крыс с аллоксановым диабетом // Бюл. СО РАМН. 2010. Т. 30, № 6. С. 101–104.
10. Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells // Biol. Chem. 1964. Feb. V. 239, № 2. P. 375–380.
11. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбин Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты организма. СПб.: Фолиант, 2000. 103 с.
12. Davies K.J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. 1. General aspects // J. Biol. Chem. 1987. Jul. V. 262, № 20. P. 9895–9901.
13. Anderson M.E. Determination of glutathione and glutathione sulfide in biological samples // Methods Enzymol. 1985. V. 113. P. 548–555.
14. Little C., O'Brien P.J. An intracellular GSH-peroxidase with a lipid peroxide substrate // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1968. Apr. V. 31, № 2. P. 45–150.
15. Burchill B.R., Oliver J.M., Pearson C.B., Leinbach E.D., Berlin R.D. Microtubule dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes // J. of Cell Biology. 1978. Feb. V. 76, № 2. P. 439–447.
16. Stadtman E.R., Levine R.L. Protein oxidation // Ann N. Y. Acad. Sci. 2000. № 899. P. 191–208. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06187.x. Epub. 2006. Jan. 25.
17. Grimsrud P.A., Xie H., Griffin T.J., Bernlohr D.A. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes // J. Biol. Chem. 2008. Aug. V. 283, № 32. P. 21837–21841. doi: 10.1074/jbc.R700019200. Epub 2008. Apr. 29.
18. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона. I. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы // Биомед. химия. 2009. Т. 55, № 3. С. 255–277.

Поступила в редакцию 12.02.2014 г.

Утверждена к печати 07.05.2014 г.

Шахристова Евгения Викторовна (✉) – канд. мед. наук, руководитель научно-образовательного центра молекулярной медицины СибГМУ (г. Томск).

Степовая Елена Алексеевна – д-р мед. наук, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии СибГМУ (г. Томск).

Иванов Владимир Владимирович – канд. биол. наук, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии СибГМУ (г. Томск).

Носарева Ольга Леонидовна – канд. мед. наук, доцент, ст. преподаватель кафедры биохимии и молекулярной биологии СибГМУ (г. Томск).

Рязанцева Наталья Владимировна – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой молекулярной медицины и клинической лабораторной диагностики СибГМУ (г. Томск).

Новицкий Вячеслав Викторович – заслуженный деятель науки РФ, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, зав. кафедрой патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS AND GLUTATHIONE SYSTEM IN ADIPOCYTES UNDER DIABETES

Shakhristova Ye.V., Stepovaya Ye.A., Ivanov V.V., Nosareva O.L., Ryazantseva N.V., Novitsky V.V.

Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

ABSTRACT

Currently, diabetes ranks third in relation to medical and social significance after cardiovascular diseases and cancer and is the leading cause of blindness; it greatly increases the risk of myocardial infarction, coronary heart disease, nephropathy and hypertension in patients with this disorder; therefore clinical and experimental studies aimed at investigation of diabetes emergence and development mechanisms are urgent.

The aim of the study was to investigate the status of oxidative modification of proteins and glutathione-dependent antioxidant defense system in adipocytes of rats with alloxan diabetes under conditions of oxidative stress.

Material and methods. Development of type 1 diabetes was induced in rats by alloxan administration (90 mg/kg of body mass). Adipocytes were obtained from epididymal adipose tissue of rats. The level of carbonyl derivatives of proteins, oxidized tryptophan, bityrosine, general, reduced, oxygenated and protein-bound glutathione, as well as glutathione peroxidase activity in adipocytes of rats was determined.

Results. In adipocytes of rats with alloxan diabetes, concentration of carbonyl derivatives of proteins, bityrosine and oxidized tryptophan increased on the background of redox-potential of glutathione system and glutathione peroxidase activity decrease.

Conclusion. The obtained data indicate the activation of free-radical oxidation of proteins and reduction of antioxidant defense under conditions of oxidative stress in the adipose tissue of rats with alloxan diabetes; this process plays an important role in pathogenesis of diabetes and its complications development.

KEY WORDS: diabetes mellitus, adipocyte, oxidative stress, carbonyl derived proteins, oxidated tryptophan, bityrosine, glutathione.

Bulletin of Siberian Medicine, 2014, vol. 13, no. 3, pp. 84–90

References

1. Suntsov Yu.I., Bolotskaya L.L., Maslova O.V., Kazakov I.V. *Diabetes Mellitus*, 2011, no. 1, pp. 15–18 (in Russian).
2. Dubinina Ye.Ye. *Products of metabolism of oxygen in the functional activity of cells (life and death, creation and destruction). Physiological and clinical-biochemical aspects.* St. Petersburg, Medical press Publ., 2006. 400 p. (in Russian).
3. Lushchak V.I. *Biochemistry*, 2007, vol. 72, no. 8, pp. 995–1015 (in Russian).
4. Menshchikova Ye.B., Zenkov N.K., Lankin V.Z., Bondar I.A., Trufakin V.A. *Oxidative stress: Pathological conditions and diseases.* Novosibirsk, ART Publ., 2008. 284 p.
5. Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Clin. Invest.*, 2004, Dec., vol. 114, no. 12, pp. 1752–1761. doi: 10.1172/JCI200421625.
6. Shakhristova Ye.V., Stepovaya Ye.A., Ivanov V.V., Nosareva O.L., Dzuman A.N., Ryazantseva N.V., Novitsky V.V. *Molecular Medicine*, 2014, no. 1, pp. 59–64 (in Russian).
7. Ivanov V.V., Shakhristova Ye.V., Stepovaya Ye.A., Fyodorova T.S., Novitsky V.V. *Adipocyte. Diabetes mellitus. Oxidative stress.* Tomsk, Print Manufacture Publ., 2013. 112 p. (in Russian).
8. Ivanov V.V., Shakhristova Ye.V., Stepovaya Ye.A., Zhavoronok T.V., Novitsky V.V. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2011, vol. 151, no. 3, pp. 314–317 (in Russian).
9. Ivanov V.V., Shakhristova Ye.V., Stepovaya Ye.A., Zhavoronok T.V., Novitsky V.V. *Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2010, vol. 30, no. 6, pp. 101–104 (in Russian).
10. Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. *Biol. Chem.*, 1964, Feb., vol. 239, no. 2, pp. 375–380.
11. Arutyunyan A.V., Dubinina Ye.Ye., Zybina N.N. *Evaluation methods of free radical oxidation and antioxidant protection of the organism.* St. Petersburg, Foliant Publ., 2000. 103 p. (in Russian).
12. Davies K.J. Protein damage and degradation by oxygen radi-

1. General aspects. *J. Biol. Chem.*, 1987, Jul., vol. 262, no. 20, pp. 9895–9901.
13. Anderson M.E. Determination of glutathione and glutathione sulfide in biological samples. *Methods Enzymol.*, 1985, vol. 113, pp. 548–555.
14. Little C., O'Brien P.J. An intracellular GSH-peroxidase with a lipid peroxide substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1968, Apr., vol. 31, no. 2, pp. 45–150.
15. Burchill B.R., Oliver J.M., Pearson C.B., Leinbach E.D., Berlin R.D. Microtubule dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes. *J. of Cell Biology*, 1978, Feb., vol. 76, no. 2, pp. 439–447.
16. Stadtman E.R., Levine R.L. Protein oxidation. *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 2000, no. 899, pp. 191–208. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06187.x. Epub. 2006. Jan. 25.
17. Grimsrud P.A., Xie H., Griffin T.J., Bernlohr D.A. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *J. Biol. Chem.*, 2008, Aug., vol. 283, no. 32, pp. 21837–21841. doi: 10.1074/jbc.R700019200. Epub 2008. Apr. 29.
18. Kulinsky V.I., Kolesnichenko L.S. *Biochemistry*, 2009, vol. 55, no. 3, pp. 255–277 (in Russian).

Shakhrystova Yevgeniya V. (✉), Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Stepovaya Yelena A., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Ivanov Vladimir V., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Nosareva Olga L., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Ryazantseva Natalia V., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Novitsky Vyacheslav V., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

✉ **Shakhrystova Yevgeniya V.**, Ph. +7-903-913-0293; e-mail: shaxristova@yandex.ru