

УДК 616.379-008.646:577.121.7

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-134-143

Для цитирования: Иванов В.В., Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Литвяков Н.В., Перекуча Н.А., Носарева О.Л., Фёдорова Т.С., Новицкий В.В. Окислительный стресс в патогенезе сахарного диабета 1 типа: роль ксантиноксидазы адипоцитов. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 134–143.

Окислительный стресс в патогенезе сахарного диабета 1 типа: роль ксантиноксидазы адипоцитов

Иванов В.В.¹, Шахристова Е.В.¹, Степовая Е.А.¹, Литвяков Н.В.²,
Перекуча Н.А.¹, Носарева О.Л.¹, Фёдорова Т.С.¹, Новицкий В.В.¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии, Томский национальный исследовательский
медицинский центр (ТНИМЦ) Российской академии наук (РАН)
Россия, 634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Согласно современным представлениям о механизмах возникновения сахарного диабета 1 и 2 типов и развития их осложнений, важную роль играет окислительный стресс. Источниками активных форм кислорода при сахарном диабете являются реакции гликозилирования белков, дыхательная цепь митохондрий, мембраносвязанная НАДФН-оксидаза и другие ферменты. Важным ферментативным источником супероксид-анион радикала и H_2O_2 является ксантиноксидоредуктаза, которая в физиологических условиях находится преимущественно в ксантиндегидрогеназной форме и может обратимо или необратимо переходить в ксантиноксидазу, в результате окислительной модификации с образованием дисульфидных связей в молекуле белка. У грызунов ксантиноксидоредуктаза в жировой ткани экспрессируется с более высокой скоростью по сравнению с другими тканями.

Цель исследования – установить роль ксантиноксидазы в развитии окислительного стресса в адипоцитах крыс при экспериментальном сахарном диабете 1 типа.

Материал и методы. Материалом для исследования служили самцы крыс Wistar, у которых моделировали экспериментальный сахарный диабет с применением двух разных диабетогенов аллоксана и стрептозотоцина. Иммунорадиометрическим методом в сыворотке крови контрольных крыс и животных с экспериментальным диабетом определяли содержание инсулина, ферментативными методами – уровень глюкозы и мочевой кислоты, методом FOX-2 – содержание первичных продуктов перекисного окисления липидов (гидроперекисей липидов), флуоресцентным методом – ксантиноксидазную активность в изолированных адипоцитах эпидидимальной жировой ткани и экспрессию мРНК ксантиндегидрогеназы.

Результаты. У крыс с экспериментальным диабетом развивался индуцированный гипергликемией окислительный стресс. Повышение содержания гидроперекисей липидов в адипоцитах наблюдалось при увеличении активности ксантиноксидазы. Повышение активности ферментов в условиях окислительного стресса в адипоцитах крыс с экспериментальным сахарным диабетом сопровождалось повышением вклада ксантиноксидазной активности в общую ксантиндегидрогеназную, что отражалось в увеличении отношения активности ксантиноксидазы и ксантиндегидрогеназы. Окислительный стресс в адипоцитах при экспериментальном сахарном диабете 1 типа вызывает окислительную посттрансляционную модификацию фермента и переход ксантиндегидрогеназной формы в ксантиноксидазную, что приводит

✉ Носарева Ольга Леонидовна, e-mail: olnosareva@yandex.ru.

к дальнейшему увеличению продукции активных форм кислорода. Ингибитор ксантиноксидазы снижает содержание гидроперекисей липидов в адипоцитах крыс. Таким образом, ксантиноксидаза может быть потенциальной мишенью для защиты от развития окислительного стресса в жировой ткани крыс при сахарном диабете 1 типа.

Выводы. Окислительный стресс в жировой ткани крыс при аллоксановом и стрептозотоциновом диабете обусловлен в определенной мере повышением экспрессии мРНК гена ксантиндегидрогеназы и пострансляционной окислительной модификацией ксантиндегидрогеназной активности в ксантиноксидазную. Ингибитор ксантиноксидазы аллопуринол снижает индуцированный аллоксаном повышенный уровень гидроперекисей липидов в сыворотке крови в изолированных адипоцитах крыс, что свидетельствует о важной роли ксантиноксидазы в развитии окислительного стресса в адипоцитах при экспериментальном сахарном диабете 1 типа.

Ключевые слова: экспериментальный сахарный диабет, аллоксан, стрептозотцин, ксантиноксидаза, адипоциты, гидроперекиси липидов, окислительный стресс.

ВВЕДЕНИЕ

Активные формы кислорода (АФК) играют важную роль в патогенезе сахарного диабета (СД) на стадии его возникновения (деструкция В-клеток островков Лангерганса поджелудочной железы) и в период развития осложнений [1–3]. Источниками АФК при СД являются реакции гликозилирования белков, дыхательная цепь митохондрий, мембраносвязанная НАДФН-оксидаза и другие ферменты [4]. Важным ферментативным источником супероксид-анион (O_2^-) радикала и H_2O_2 в клетках является ксантиноксидоредуктаза, которая в физиологических условиях находится преимущественно в ксантиндегидрогеназной форме и может обратимо или необратимо переходить в ксантиноксидазу, в результате образования дисульфидных связей цистеиновых остатков Cys535 и Cys992 [5]. Ксантиноксидазная реакция способствует образованию высокорекреационного ОН-радикала, который возникает в результате дальнейшего восстановления H_2O_2 и является мощным индуктором перекисного окисления липидов (ПОЛ) [2]. Основная физиологическая функция фермента – участие в катаболизме пуринов, при этом ксантиндегидрогеназная форма в качестве акцептора электронов использует главным образом НАД⁺, оксидазная же – молекулярный кислород. В то же время ксантиноксидоредуктаза – единственный метаболический источник мочевой кислоты, важного антиоксиданта внеклеточных жидкостей, и повышение ее активности в условиях окислительного стресса может играть двойственную роль [6]. У грызунов ксантиноксидоредуктаза в адипоцитах экспрессируется с более высокой скоростью по сравнению с другими тканями и ее ксантиноксидазная активность может

вносить существенный вклад в развитие окислительного стресса в жировой ткани при ожирении [7]. Ранее нами было показано, что в адипоцитах эпидидимальной жировой ткани крыс с аллоксановым диабетом увеличено содержание продуктов липидной перекисидации и окислительной модификации белков и снижен редокс-потенциал системы глутатиона [1, 8].

Цель исследования – установить роль ксантиноксидазы в развитии окислительного стресса в адипоцитах крыс при экспериментальном сахарном диабете 1 типа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на 32 аутобредных самцах крыс Wistar массой (310 ± 50) г, полученных из отдела экспериментальных биологических моделей НИИФиЗМ им. Е.Д. Гольдберга (г. Томск). Животных содержали в стандартных условиях вивария на обычном рационе кормления, при свободном доступе к воде и пище. Исследования проводились с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации.

Методом случайной выборки животные были распределены на три группы: восемь крыс составили группу контроля, у восьми крыс диабет вызывали инъекцией стрептозотоцина (65 мг/кг, внутривнутрибрюшинно) и у 16 крыс диабет индуцировали четырехкратной инъекцией аллоксана (90 мг/кг, внутривнутрибрюшинно). Для выявления роли ксантиноксидазы в развитии окислительного стресса при экспериментальном СД 1 типа исследовали влияние ингибитора ксантиноксидазы аллопуринола на содержание гидроперекисей липидов, активность ксантиноксидазы и экспрессию

мРНК ксантиндегидрогеназы в адипоцитах изолированных из эпидидимальной жировой ткани. Аллопуринол вводили дважды внутрибрюшинно восьми крысам с аллоксановым диабетом на 12-й день после последней инъекции диabetогена по предложенной схеме [9]. Препарат вводили за 6 и 30 ч до декапитации.

Через 2 нед после введения диabetогенов у животных из хвостовой вены забирали 10 мкл цельной крови, в которой с помощью системы контроля определяли уровень кетонов в крови (Великобритания). Затем крыс усыпляли CO_2 -асфиксией, получали сыворотку крови и эпидидимальную жировую ткань, из которой выделяли адипоциты с использованием коллагеназы (Sigma Aldrich, США) по методу M. Rodbell [10]. Жизнеспособность выделенных клеток оценивали с трипановым синим (Serva, США), при этом доля живых клеток составляла не менее 95%.

В сыворотке крови контрольных крыс и животных с экспериментальным диабетом определяли содержание инсулина иммунорадиометрическим методом при помощи наборов Insulin (e) IRMA KIT (Immunotech, Чехия), глюкозы и мочевой кислоты с помощью ферментативных наборов фирмы Chronolab (Испания). В сыворотке крови и изолированных адипоцитах измеряли содержание первичных продуктов ПОЛ – гидроперекисей липидов, которые определяли методом FOX-2 [11] и ксантиндегидрогеназную и ксантиноксидазную активность [12]. Для этого адипоциты гомогенизировали в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 0,1 мМ ЭДТА и 10 мМ дитиотриетол, чтобы предотвратить окисление сульфгидрильных групп фермента при выделении. Гомогенат центрифугировали при 4 °С (20000 g, 20 мин), и в надосадке определяли ксантиноксидазную активность с использованием субстрата птерина (Sigma Aldrich, США) по интенсивности флуоресценции продукта реакции – изоксантоптерина [12]. Ксантиндегидрогеназную активность измеряли при добавлении 40 мкМ метиленового синего. Интенсивность флуоресценции измеряли на планшетном спектрофлуориметре Cary Eclipse (Agilent, США). Активность фермента выражали в нМ/мин/мг белка. Концентрацию белка в гомогенатах определяли по методу Бредфорда [13].

В изолированных адипоцитах проводили анализ экспрессии гена ксантиндегидрогеназы (Xdh) методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ПЦР) в режиме реального времени на амплификаторе LightCycler®480 (Roche, Швейцария) по технологии TaqMan. Методом фенол-хлороформной экс-

тракции из жировых клеток выделяли мРНК с использованием реагента TRIzol® (Invitrogen, США). По матрице мРНК получали комплементарную ДНК (кДНК) в реакции обратной транскрипции с помощью набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва). Для ПЦР использовали набор Sibenzyme (Россия). Режим амплификации включал: предварительную денатурацию – один цикл 95 °С 5 мин, денатурацию – один цикл 94 °С 15 с, отжиг при 60 °С – 10 с и элонгацию при 70 °С – 30 с. Общее количество циклов – 45. Праймеры и зонды (FAM-BHQ1) подбирали с использованием программы VectorNTI Advance 11.5 и базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>). Для гена Xdh: прямой праймер 5'-САСТААСАССГТССССААС-3', обратный праймер 5'-GGTTCCAGCCTTTTCAGTATG-3' и зонд FAM-5'-СТСТGCCAGTGCTGACСТСААТG-3'-BHQ1. Экспрессию гена выражали в условных единицах по отношению к экспрессии гена-рефери Actb (beta-actin); последовательность прямого праймера 5'-GAAAAGATGACCCAGATCATGT-3', обратного праймера 5'-GGGACAACACAGCCTGGAT-3' и зонда FAM-5'-AGACСТTCAACACCCСAGCCAT-3'-BHQ1. Относительная экспрессия гена Xdh была оценена с помощью метода $\Delta\Delta\text{Ct}$ [14].

При оценке полученных данных использовали методы статистического описания и проверки статистических гипотез с использованием программы SPSS 11.0 for Windows. Проверка на соответствие выборки нормальному закону распределения проводилась критерием Шапиро – Уилка. В связи с отсутствием согласия данных с нормальным распределением на уровне значимости $p < 0,05$ вычисляли средневыборочные характеристики: медиану M_e , первый и третий квартили (Q_1 – Q_3). Достоверность различий выборок оценивали с помощью непараметрических критериев Манна – Уитни и Краскела – Уоллиса для малых групп. Различия считались достоверными при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$. Межгрупповой анализ проводили с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время в мире широко применяются экспериментальные модели сахарного диабета, индуцированного аллоксаном или стрептозотоцином [15]. Следует отметить, что обе модели имеют как преимущества, так и недостатки, поскольку диabetогены оказывают токсическое действие не только на В-клетки поджелудочной железы, но и другие органы и ткани.

В механизме диабетогенного действия аллоксана более выражено прооксидантное действие, поскольку он окисляется в диалуровую кислоту с последующей генерацией супероксидного анион-радикала и гидроксильного радикала, который вызывает повреждение ДНК В-клеток и их гибель [15]. Стрептозотоцин, являясь алкилирующим агентом, также повреждает ДНК В-клеток, но в отличие от аллоксанового диабета при моделировании СД 1 типа стрептозотоцином наряду с гипергликемией, гипоинсулинемией и некрозом наблюдается инфильтрация панкреатических островков лимфоцитами [16]. Поэтому для установления роли ксантиноксидазы адипоцитов в патогенезе сахарного диабета 1 типа использованы обе модели экспериментального сахарного диабета.

В результате экспериментов установлено, что через 2 нед после инъекций аллоксана и

стрептозотоцина уровень глюкозы в крови крыс составлял 21,2 (16,9–22,6) мМ/л и 30,3 (25,9–32,7) мМ/л соответственно (в контроле – 5,2 (5,0–5,7) мМ/л), что свидетельствует о развитии стойкой гипергликемии, характеризующей СД (табл. 1). Гипергликемия у опытных животных обусловлена выраженной гипоинсулинемией вследствие гибели В-клеток под действием диабетогенов. Содержание инсулина в плазме крови крыс снижалось в 2,9 ($p < 0,001$) и 3,4 раза ($p < 0,001$) соответственно при введении аллоксана и стрептозотоцина (см. табл. 1). При этом в крови экспериментальных животных увеличивалось содержание кетоновых тел, что является характерной особенностью сахарного диабета 1 типа. Таким образом, через 2 нед после введения диабетогенов у экспериментальных животных наблюдались основные симптомы СД 1 типа: гипоинсулинемия, гипергликемия и кетонемия.

Т а б л и ц а 1

Показатель	Группа животных		
	1. Контроль, <i>n</i> = 8	2. Аллоксан, <i>n</i> = 8	3. Стрептозотоцин, <i>n</i> = 8
Глюкоза, мМ/л	5,2 (5,0–5,7)	21,2 (16,9–22,6) $p_{2-1} < 0,001$	30,3 (25,9–32,7) $p_{3-1} < 0,001$
Инсулин, мкЕд/мл	26,2 (24,0–27,8)	9,2 (8,3–10,1) $p_{2-1} < 0,001$	7,6 (6,7–8,8) $p_{3-1} < 0,001$
Кетоновые тела, мМ/л	0,65 (0,6–0,8)	1,5 (1,3–1,8) $p_{2-1} = 0,002$	1,7 (1,5–2,1) $p_{3-1} = 0,002$
Гидроперекиси липидов, мкМ	5,9 (5,0–7,1)	18,1 (14,5–20,3) $p_{2-1} < 0,001$	21,6 (19,2–23,1) $p_{3-1} < 0,001$
Мочевая кислота, мМ/л	74,6 (55,3–88,4)	94,6 (89,9–98,9) $p_{2-1} = 0,046$	110,4 (95,4–139,1) $p_{3-1} = 0,002$
Ксантиноксидаза, нМ/мин/мл	1,54 (1,45–1,62)	2,50 (2,31–2,81) $p_{2-1} < 0,001$	3,64 (3,46–3,96) $p_{3-1} < 0,001$
Ксантиндегидрогеназа, нМ/мин/мл	2,45 (2,13–2,87)	3,62 (3,29–3,94) $p_{2-1} < 0,001$	4,82 (4,13–5,05) $p_{3-1} < 0,001$
Ксантиноксидаза/ксантиндегидрогеназа	0,63	0,69	0,75

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2: *n* – количество животных в группе; *p* – уровень значимости различий, рассчитанный относительно контрольных величин.

У крыс с экспериментальным диабетом развивался индуцированный гипергликемией окислительный стресс, о чем свидетельствует увеличение содержания в сыворотке крови гидроперекисей липидов, определенных методом FOX-2 – при аллоксановом диабете в 3,1 раза ($p < 0,001$) и при стрептозотоциновом в 3,7 раза ($p < 0,001$) (см. табл. 1). Повышенное содержание маркёров окислительного стресса в крови больных СД 1 и 2 типов, а также животных при экспериментальных моделях СД было отмечено ранее и отража-

ет развитие свободнорадикального окисления в условиях гипергликемии [3]. Показан существенный вклад жировой ткани в продукцию АФК при экспериментальном СД 2 типа, при котором существенно увеличены размеры жировой ткани [7]. Мы впервые демонстрируем повышение уровня гидроперекисей липидов в 1,6 ($p < 0,001$) и 1,7 ($p < 0,001$) раза в адипоцитах у крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа, индуцированным аллоксаном и стрептозотоцином, соответственно (табл. 2).

Влияние аллоксана и стрептозотоцина на содержание гидроперекисей липидов, ксантиноксидазную и ксантиндегидрогеназную активность и величину экспрессии мРНК гена ксантиндегидрогеназы (*Xdb*) в адипоцитах крыс, $Me (Q_1-Q_3)$

Показатель	Группа животных		
	1. Контроль, <i>n</i> = 8	2. Аллоксан, <i>n</i> = 8	3. Стрептозотоцин, <i>n</i> = 8
Гидроперекиси липидов, нМ/мг белка	5,7 (5,4–6,2)	8,9 (8,6–9,2) $p_{2-1} < 0,001$	9,9 (9,8–10,2) $p_{3-1} < 0,001$
Ксантиноксидаза, нМ/мин/мг белка	0,095 (0,074–0,101)	0,163 (0,140–0,192) $p_{2-1} = 0,002$	0,192 (0,167–0,193) $p_{3-1} = 0,002$
Ксантиндегидрогеназа, нМ/мин/мг белка	0,141 (0,103–0,171)	0,186 (0,171–0,198) $p_{2-1} = 0,012$	0,210 (0,190–0,217) $p_{3-1} = 0,01$
Ксантиноксидаза/ ксантиндегидрогеназа	0,67	0,88	0,91
Величина экспрессии мРНК гена <i>Xdb</i> , усл.ед.	0,07 (0,05–0,08)	0,16 (0,14–0,19) $p_{2-1} < 0,001$	0,19 (0,16–0,23) $p_{3-1} < 0,001$

Развитие окислительного стресса в адипоцитах крыс как при аллоксановом, так и стрептозотоциновом диабете свидетельствует о том, что это обусловлено гипoinsулинемией и гипергликемией, а не токсическим действием диабетогенов.

В сыворотке крови крыс с аллоксановым и стрептозотоциновым диабетом наблюдалось повышение ксантиноксидазной активности в 1,6 ($p < 0,001$) и 2,4 ($p < 0,001$) раза и ксантиндегидрогеназной активности в 1,5 ($p < 0,001$) и 2 ($p < 0,001$) раза соответственно (см. табл. 1). Увеличение активности ферментов сопровождалось повышением вклада ксантиноксидазной активности в общую ксантиндегидрогеназную, о чем свидетельствует увеличение отношения активности ксантиноксидазы и ксантиндегидрогеназы с 0,63 в контроле до 0,69 и 0,75 при аллоксановом и стрептозотоциновом диабете (см. табл. 1). Известно, что основным источником ксантиноксидазы в сыворотке крови является печень, из которой фермент распределяется по всему кровеносному руслу и прикрепляется к эндотелию гепарансульфатом [9]. По данным литературы, при экспериментальном СД 1 типа у крыс ксантиноксидазная активность повышена в печени [9]. При этом жировая ткань обладает высокой ксантиноксидазной активностью, и зрелые адипоциты продуцируют и секретируют мочевую кислоту [7]. У крыс с аллоксановым и стрептозотоциновым СД в изолированных адипоцитах ксантиндегидрогеназная активность возрастала в 1,3 ($p = 0,012$) и 1,5 ($p = 0,01$) раза, а ксантиноксидазная в 1,7 ($p = 0,002$) и 2 ($p = 0,002$) раза соответственно (см. табл. 2).

Увеличение активности ферментов в условиях окислительного стресса в адипоцитах крыс с экспериментальным СД сопровождалось повышением вклада ксантиноксидазной активности в

общую ксантиндегидрогеназную, что отражалось в увеличении отношения активности ксантиноксидазы и ксантиндегидрогеназы с 0,67 в контроле до 0,88 и 0,91 при аллоксановом и стрептозотоциновом диабете (см. табл. 2).

Ксантиноксидаза является сложным ферментом, активность которого регулируется на транскрипционном и посттрансляционном уровнях, а продукты реакции обладают прооксидантным (супероксид-анион кислорода и пероксид водорода) и антиоксидантным (мочевая кислота) действием [5].

Установлено, что повышение ксантиндегидрогеназной активности в адипоцитах при аллоксановом и стрептозотоциновом диабете обусловлено увеличением экспрессии мРНК гена ксантиндегидрогеназы в 2,3 ($p < 0,001$) и 2,7 раза ($p < 0,001$) соответственно по сравнению со значениями в группе контроля (см. табл. 2).

На транскрипционном уровне экспрессия ксантиндегидрогеназы регулируется многими факторами и в том числе увеличивается при гипоксии и под влиянием провоспалительных цитокинов, повышенная секреция последних лежит в основе патогенеза СД 1 типа [3]. Недавно было показано, что при индуцированном стрептозотоцином и аллоксаном экспериментальном диабете с симптомами СД 1 типа у крыс в жировой ткани увеличивается продукция провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α [17; 18], которые могут оказывать локальное и системное воздействие на метаболические процессы, в том числе индуцировать экспрессию мРНК ксантиндегидрогеназы. Таким образом, увеличение ксантиндегидрогеназной активности в адипоцитах эпидидимальной жировой ткани обусловлено увеличением величины экспрессии мРНК фермента.

Известно, что в нормальных условиях фермент находится преимущественно в ксантиндегидроге-

назой форме и может в результате окисления SH-групп цистеиновых остатков Cys535 и Cys992 с образованием дисульфидных связей обратимо или необратимо модифицироваться в ксантиноксидазу [19]. Таким образом, окислительный стресс вызывает окислительную посттрансляционную модификацию фермента и переход ксантиндегидрогеназной формы в ксантиноксидазную, что приводит к дальнейшему увеличению продукции АФК. Это подтверждается полученными современными данными о способности антиоксидантов токоферола и селена снижать индуцируемую окислительным стрессом повышенную активность ксантиноксидазы в печени и почках крыс со стрептозотоциновым диабетом [19].

Основная функция ксантиноксидазы состоит в образовании конечного продукта катаболизма пуринов мочевой кислоты, уровень которой в сыворотке крови определяется активностью ксантиноксидазы и ксантиндегидрогеназы главным образом в печени. Содержание мочевой кислоты в сыворотке крови у крыс с аллоксановым и стрептозотоциновым диабетом увеличивалось в 1,3 раза ($p = 0,046$) и 1,5 раза ($p = 0,002$) соответственно по сравнению со значениями в контрольной группе (см. табл. 1). Повышение активности ксантиноксидазы и ксантиндегидрогеназы в адипоцитах крыс, обнаруженное в наших экспериментах, свидетельствует о вкладе жировой ткани в гиперурикемию при экспериментальном СД 1 типа.

Поскольку мочевая кислота оказывает существенный вклад в антиоксидантный потенциал сыворотки крови [2], повышение ее уровня у животных с экспериментальным СД 1 типа можно рассматривать как адаптивную реакцию на оксидативный стресс, индуцированный гипергликемией. В то же время мочевая кислота в адипоцитах активирует НАДФН-оксидазу, участвующую в редокс-зависимой внутриклеточной передаче сигналов, и образующийся при чрезмерной активации этого фермента супероксид-анион кислорода индуцирует в клетках окислительный стресс [6].

Для выявления роли ксантиноксидазы в развитии окислительного стресса в адипоцитах при экспериментальном СД, после индукции диабета аллоксаном крысам вводили аллопуринол. Ингибитор ксантиноксидазы снижал содержание гидроперекисей липидов в сыворотке крови и адипоцитах крыс с экспериментальным СД, индуцированным аллоксаном (рис. 1). Введение аллопуринола крысам с аллоксановым диабетом не оказывало влияния на повышенную величину экспрессии ксантиндегидрогеназы (рис. 2). Это

свидетельствует о том, что действие препарата обусловлено ингибированием активности ксантиноксидазы, а не снижением транскрипции мРНК фермента. Таким образом, ксантиноксидаза может быть потенциальной мишенью для защиты от развития окислительного стресса в жировой ткани крыс при СД 1 типа.

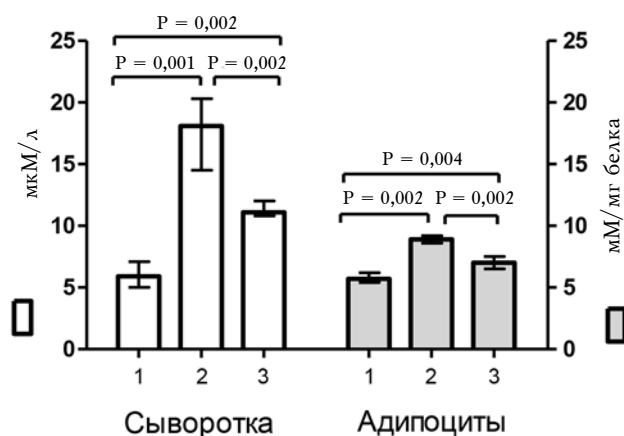


Рис. 1. Влияние аллоксана и аллопуринола на содержание гидроперекисей липидов (ГПЛ) в сыворотке крови и адипоцитах крыс: 1 – контроль ($n = 8$); 2 – аллоксановый диабет ($n = 8$); 3 – аллоксановый диабет + аллопуринол ($n = 8$); n – количество животных в группе

Fig. 1. Alloxan and allopurinol effect on the amount of lipid hydroperoxides (GPL) in blood serum and adipocytes of rats: 1 – control ($n = 8$); 2 – alloxan diabetes ($n = 8$); 3 – alloxan diabetes + allopurinol ($n = 8$); n – the number of animals in the group

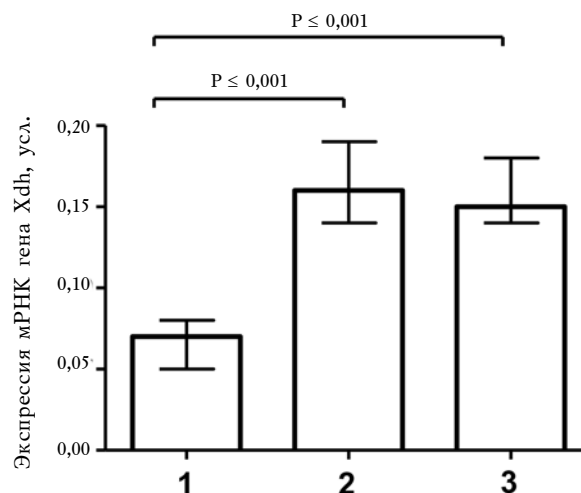


Рис. 2. Влияние аллоксана и аллопуринола на величину экспрессии мРНК гена ксантиндегидрогеназы (*Xdh*) в адипоцитах крыс: 1 – контроль ($n = 8$); 2 – аллоксановый диабет ($n = 8$); 3 – аллоксановый диабет + аллопуринол ($n = 8$); n – количество животных в группе

Fig. 2. Alloxan and allopurinol effect on the mRNA expression of the xanthine dehydrogenase gene (*Xdh*) in adipocytes of rats: 1 – control ($n = 8$); 2 – alloxan diabetes ($n = 8$); 3 – alloxan diabetes + allopurinol ($n = 8$); n – the number of animals in the group

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие окислительного стресса в адипоцитах эпидидимальной жировой ткани крыс с экспериментальным диабетом, индуцированным аллоксаном и стрептозотоцином, связано с увеличением продукции АФК вследствие повышения экспрессии мРНК гена ксантиндегидрогеназы и ксантиноксидазной активности в жировых клетках. Ингибитор ксантиноксидазы аллопуринол снижает содержание гидроперекисей липидов в адипоцитах, что свидетельствует о важной роли ксантиноксидазы в развитии окислительного стресса в жировой ткани при экспериментальном СД. Эти данные показывают, что ксантиноксидаза является одним из источников АФК индуцированных гипергликемией в адипоцитах эпидидимальной жировой ткани и ингибирование ксантиноксидазы уменьшает окислительный стресс. Поскольку окислительный стресс играет важную роль в патогенезе воспаления и каскада событий, ведущих к развитию диабетических осложнений, ксантиноксидаза может быть потенциальной терапевтической мишенью для уменьшения нарушений, связанных с окислительным стрессом, и прогрессирования этих явлений при СД 1 типа.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ И ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи, и сообщают о вкладе авторов. Иванов В.В. – разработка концепции и дизайна, проверка критически важного интеллектуального содержания, проведение практической части исследования, анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи. Шахристова Е.В. – проведение практической части исследования, анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи. Степовая Е.А. – анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи, окончательное утверждение для публикации рукописи. Литвяков Н.В. – разработка дизайна, анализ и интерпретация данных. Перекуча Н.А. – проведение практической части исследования. Носарева О.Л. – анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи. Фёдорова Т.С. – анализ и интерпретация данных. Новицкий В.В. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, окончательное утверждение для публикации рукописи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (соглашение № 14.W02.16.7906-НШ).

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Протокол исследования одобрен этическим комитетом СибГМУ (№ 4718 от 18.04.2016 г.)

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Иванов В.В., Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Носарева О.Л., Федорова Т.С., Новицкий В.В. Молекулярные механизмы модуляции липолиза в жировой ткани и развитие инсулинорезистентности при сахарном диабете // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2014; 4: 111–119.
2. Ivanov V.V., Shakhristova E.V., Stepovaya E.A., Nosareva O.L., Fedorova T.S., Novitsky V.V. Molekulyarnyye mekhanizmy modulyatsii lipoliza v zhirovoy tkani i razvitiye insulinorezistentnosti pri sakharnom diabete [Molecular mechanisms of modulation of lipolysis in adipose tissue and development of insulinresistance in diabetes] // *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya – Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* 2014; 4: 111–119 (in Russian).
3. 2. 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.
4. Men'shhikova E.B., Zenkov N.K., Lankin V.Z. Bondar' I.A., Trufakin V.A. Okislitel'nyy stress: patologicheskiye sostoyaniya i zabolevaniya [Oxidative stress: Pathological conditions and diseases]. Novosibirsk: ARTA Publ., 2008: 284 (in Russian).
5. 3. Rains J.L., Jain S.K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes // *Free Radic. Biol. Med.* 2011; 50(5): 567–575. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.006.
6. 4. Giacco F., Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications // *Circ. Res.* 2010; 107(9): 1058–1070. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223545.
7. 5. Battelli M.G., Bolognesi A., Polito L. Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: new emerging roles for a multi-tasking enzyme // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014; 1842 (9): 1502–1517. DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.05.022.
8. 6. Sautin Y.Y., Johnson R.J. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox // *Nucleosides. Nucleotides. Nucleic Acids.* 2008; 27(6): 608–619. DOI: 10.1080/15257770802138558.
9. 7. Tsushima Y., Nishizawa H., Tochino Y., Nakatsuji H., Sekimoto R., Nagao H., Shirakura T., Kato K., Imaizumi K., Takahashi H., Tamura M., Maeda N., Funahashi T., Shimomura I. Uric acid secretion from adipose tissue and its increase in obesity // *Biol. Chem.* 2013; 288(38): 27138–27149. DOI: 10.1074/jbc.M113.485094.

8. Ivanov V.V., Shakhristova E.V., Stepovaya E.A., Nosareva O.L., Fedorova T.S., Ryazantseva N.V., Novitsky V.V. Effect of insulin, the glutathione system, and superoxide anion radical in modulation of lipolysis in adipocytes of rats with experimental diabetes // *Biochemistry (Mosc)*. 2015; 80 (1): 87–96. DOI: 10.1134/S0006297915010101.
9. Romagnoli M., Gomez-Cabrera M.C., Perrelli M.G., Biasi F., Pallardy F.V., Sastre J., Poli G., Vica J. Xanthine oxidase-induced oxidative stress causes activation of NF- κ B and inflammation in the liver of type I diabetic rats // *Free Radic. Biol. Med.* 2010; 49 (2): 171–177. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.024.
10. Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells // *Biol. Chem.* 1964; 266 (24): 15817–15823.
11. Hermes-Lima M., Willmore W.G., Storey K.B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylene orange complex formation // *Free Radic. Biol. Med.* 1995; 19 (3): 271–280.
12. Beckman J.S., Parks D.A., Pearson J.D., Marshall P.A., Freeman B.A. A sensitive fluorometric assay for measuring xanthine dehydrogenase and oxidase in tissues // *Free Radic. Biol. Med.* 1989; 6: 607–615.
13. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. 1976; 7 (1): 248–254.
14. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method // *Methods*. 2001; 25 (4): 402–408.
15. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes // *Diabetologia*. 2008; 51 (2): 216–226.
16. Wu J., Yan L.J. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity // *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 2015; 8: 181–188. DOI: 10.2147/DMSO.S82272.
17. Molanouri Shamsi M., Mahdavi M., Quinn L.S., Gharakhanlou R., Isanegad A. Effect of resistance exercise training on expression of Hsp70 and inflammatory cytokines in skeletal muscle and adipose tissue of STZ-induced diabetic rats // *Cell Stress Chaperones*. 2016; 21(5): 783–791. DOI: 10.1007/s12192-016-0703-7.
18. Panveloski-Costa A.C., Silva Teixeira S., Ribeiro I.M., Serrano-Nascimento C., das Neves R.X., Favaro R.R., Seelaender M., Antunes V.R., Nunes M.T. Thyroid hormone reduces inflammatory cytokines improving glycaemia control in alloxan-induced diabetic wistar rats // *Acta Physiol. (Oxf)*. 2016; 217 (2): 130–140. DOI: 10.1111/apha.12647.
19. Ghaffari T., Nouri M., Saei A.A., Rashidi M.R. Aldehyde and xanthine oxidase activities in tissues of streptozotocin-induced diabetic rats: effects of vitamin E and selenium supplementation // *Biol. Trace Elem. Res.* 2012; 147 (1-3): 217–225. DOI: 10.1007/s12011-011-9291-7.

Поступила в редакцию 24.06.2017
Утверждена к печати 08.11.2017

Иванов Владимир Владимирович, канд. биол. наук, доцент, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск.

Шахристовая Евгения Викторовна, канд. мед. наук, доцент, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск.

Степовая Елена Алексеевна, д-р мед. наук, профессор, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск.

Литвяков Николай Васильевич, д-р биол. наук, зав. лабораторией онковирусологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ РАН, г. Томск.

Перекуча Наталья Андреевна, интерн, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск.

Носарева Ольга Леонидовна, канд. мед. наук, доцент, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск.

Фёдорова Татьяна Сергеевна, д-р мед. наук, профессор, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск.

Новицкий Вячеслав Викторович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, зав. кафедрой патофизиологии, СибГМУ, г. Томск.

(✉) **Носарева Ольга Леонидовна**, e-mail: olnosareva@yandex.ru.

УДК 616.379-008.646:577.121.7

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-134-143

For citation: Ivanov V.V., Shakhristova E.V., Stepovaya E.A., Litvjakov N.V., Perekucha N.A., Nosareva O.L., Fedorova T.S., Novitsky V.V. Oxidative stress in the pathogenesis of type 1 diabetes: the role of adipocyte xanthine oxidase. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 134–143.

Oxidative stress in the pathogenesis of type 1 diabetes: the role of adipocyte xanthine oxidase

Ivanov V.V.¹, Shakhristova E.V.¹, Stepovaya E.A.¹, Litvjakov N.V.², Perekucha N.A.¹, Nosareva O.L.¹, Fedorova T.S.¹, Novitsky V.V.¹

¹ *Siberian State Medical University (SSMU)*
2, Moskow Tract, Tomsk, 634050, Russian Federation

² *Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (TNRMC), Russian Academy of Science (RAS)*
5, Kooperativny Str., Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Rationale. According to modern understanding, oxidative stress plays an essential role in the underlying mechanisms for the emergence of type 1 and type 2 diabetes and development of complications in these conditions. The sources of reactive oxygen species in diabetes are protein glycosylation, mitochondrial respiratory chain, membrane-bound NADPH oxidase, and other enzymes. An important enzymatic source of the superoxide anion radical and H₂O₂ is xanthine oxidoreductase. Under physiological conditions, it exists mainly in the xanthine dehydrogenase form and may be reversibly or irreversibly converted to xanthine oxidase, following oxidative modification with formation of disulfide bonds in the protein molecule. In rodents, xanthine oxidoreductase in adipose tissue is expressed at a higher rate, as opposed to in other tissues.

The aim of the study was to establish the role of xanthine oxidase in development of oxidative stress in rat adipocytes in experimental type 1 diabetes.

Materials and methods. The study was conducted in male Wistar rats with experimental diabetes induced by two different diabetogenic agents – alloxan and streptozotocin. Serum concentration of insulin in the control and experimental rats was determined by the immunoradiometric assay. The levels of glucose and uric acid were measured by the enzymatic methods. The concentration of lipid hydroperoxides, primary products of lipid peroxidation, was detected by the FOX-2 method. The activity of xanthine oxidase in isolated adipocytes of epididymal adipose tissue and the expression of xanthine dehydrogenase mRNA were determined by fluorometry.

Results. The rats from the experimental group developed hyperglycemia-induced oxidative stress. The rise in the lipid hydroperoxide concentration in adipocytes was observed against the backdrop of the increased xanthine oxidase activity. The boost in the enzymatic activity under oxidative stress in adipocytes of the experimental rats was accompanied by the increase in the proportion of the xanthine oxidase activity in the total xanthine dehydrogenase plus oxidase activity. It resulted in the elevated xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase activity ratio. Oxidative stress in rat adipocytes with experimental type 1 diabetes caused oxidative post-translational modification of the enzyme and its conversion from the xanthine dehydrogenase form to the xanthine oxidase one. It resulted in the subsequent increase in reactive oxygen species production. The inhibitor of xanthine oxidase reduced the level of lipid hydroperoxides in rat adipocytes. Thus, xanthine oxidase may be a potential target to protect from oxidative stress in rat adipose tissue in type 1 diabetes.

Conclusions. Oxidative stress in adipose tissue of the rats with alloxan- and streptozotocin-induced diabetes is determined, to a certain extent, by the increased expression of xanthine dehydrogenase mRNA as well as by post-translational oxidative modification of the enzyme activity from dehydrogenase to oxidase. Allopurinol, the inhibitor of xanthine oxidase, decreases the alloxan-induced elevated level of lipid hydroperoxides in rat

serum and isolated adipocytes. It indicates a crucial role of xanthine oxidase in development of oxidative stress in adipocytes in experimental type 1 diabetes.

Key words: experimental diabetes, alloxan, streptozotocin, xanthine oxidase, adipocytes, lipid hydroperoxides, oxidative stress.

Received June 24.2017
Accepted November 08.2017

Ivanov Vladimir V., PhD, Associate Professor, Department Biochemistry and Molecular Biology with the Course of Clinical Laboratory Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Shakhrystova Evgeniya V., PhD, Associate Professor, Department Biochemistry and Molecular Biology with the Course of Clinical Laboratory Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Stepovaya Elena A., DM, Professor, Department Biochemistry and Molecular Biology with the Course of Clinical Laboratory Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Lityjakov Nicolai V., DBSc, Head of the Laboratory of Oncovirology, Cancer Research Institute, TNRMС of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation.

Perekucha Nataliya A., Intern, Department Biochemistry and Molecular Biology with the Course of Clinical Laboratory Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Nosareva Olga L., PhD, Associate Professor, Department Biochemistry and Molecular Biology with the Course of Clinical Laboratory Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Fedorova Tatayna S., DM, Professor, Department Biochemistry and Molecular Biology with the Course of Clinical Laboratory Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Novitsky Vyacheslav V., DM, Professor, Academician of RAS, Head of the Department Pathophysiology, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Nosareva Olga L.**, e-mail: olnosareva@yandex.ru.