

І. В. Геруш, О. Г. Чернюх, М. В. Дікал
ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці

ОСОБЛИВОСТІ ЗМІНИ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ КЛАСУ ТРАНСФЕРАЗ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ АЛОКСАНОВОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ У ЩУРІВ

chernyukh.oksana72@gmail.com

У роботі проведено дослідження концентрації біохімічних показників плазми крові у білих нелінійних щурів на фоні індукованого алоксанового цукрового діабету (ЦД). Алоксановий ЦД моделювали у тварин (n=20) шляхом внутрішньоочеревинного введення 5 % розчину алоксан моногідрату у розрахунку 150 мг/кг. На 14 добу експерименту проаналізовано зміни показників у порівнянні з контрольною групою (n=20). Відзначено достовірне зростання активності ферментів АСТ та ГГТ, відповідно на 84 % (p<0,01) та 79 % (p<0,01), при цьому зростання активності АЛТ було дещо нижчим – на 36 % (p<0,05). Встановлено, що на фоні істотної гіперглікемії (12,6±1,28 ммоль/л) зміна активності досліджених ферментів є більш чутливими показниками дисфункції печінки за умов розвитку гострої фази ЦД (14 доба моделювання), ніж такі загальноприйняті біохімічні показники як вміст загального білка, альбуміну, сечовини, креатиніну. Окрім того, коефіцієнти співвідношення активності ферментів вказували на гостре порушення функціонального стану печінки як первинного органу, який відповідає за перебудову метаболічних шляхів внаслідок лізису інсулін-продукуючих клітин.

Ключові слова: алоксановий цукровий діабет (ЦД), плазма крові, активність ферментів, білі щури.

Робота є фрагментом НДР «Стресіндуковані морфофункціональні та біохімічні зміни структур хронопериодичної і гепаторенальної систем у ссавців» (номер держреєстрації 0114U002472).

Статистика щодо зростання та поширеності цукрового діабету (ЦД), незважаючи на досягнення у різноманітних галузях медицини, залишається невтішною, незалежно від рівня соціально-економічного розвитку країни. Згідно даних інституту ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка Національної академії медичних наук України станом на перше січня 2015 року в нашій країні зареєстровано 1 млн. 198,5 тис. осіб (2,99% населення). Кількість хворих на ЦД у світі також неухильно зростає і за прогнозами Міжнародної Діабетичної Федерації (IFD) у 2030 р. може досягнути 552 млн. осіб, а до 2040 року – 642 млн. [6].

Проблема полягає в тому, що на даний момент не виявлено чітких молекулярних механізмів успадкування схильності до ЦД I типу, немає єдиної загальноприйнятої теорії, яка б пояснила отримані численні дані в цій області. Окрім того, різноманітні метаболічні ураження систем та органів, які розвиваються на фоні ЦД II типу є також суттєвою загрозою для здоров'я людської популяції та однією з причин інвалідизації населення.

Актуальним залишається питання щодо дослідження алоксанової хімічної моделі експериментальної діабетології, токсичний вплив якої відбувається не тільки у напрямку органу-мішені – підшлункової залози, а призводить до дезінтеграції основних біохімічних процесів життєдіяльності, внаслідок генерації величезної кількості токсичних метаболітів, в тому числі, вільнорадикальних [2-4, 11]. Згідно думки переважної більшості науковців алоксанова експериментальна модель викликає ЦД I типу, що підтверджено клінічно та морфологічно [2, 12]. Але, з огляду на багатогранність шляхів та проявів дії алоксану, існування можливості відновлення певної частини β -клітин острівків Лангерганса, внаслідок індивідуальної гетерогенності тварин, ця хімічна модель може мати риси прояву як ЦД I так і II типів [9]. Вище зазначені факти можуть пояснити широкий спектр отриманих результатів дослідження [1, 5], інколи, навіть з численними суперечностями щодо діабетогенного та токсикогенного ефектів алоксану залежно від доби дослідження, моделі ЦД, гетерогенності метаболічних проявів [7].

Метою роботи було охарактеризувати зміну активності ферментів трансфераз (АЛТ, АСТ, ГГТ) та коефіцієнтів їх співвідношення у плазмі крові білих нелінійних щурів, як найбільш чутливих біохімічних маркерів та важливих клінічних скринінгових показників ураження підшлункової залози та печінки при моделюванні алоксанового ЦД (14 доба).

Матеріал та методи дослідження. Експерименти проводилися на 40 статевозрілих нелінійних щурах самцях (*Rattus rattus L.*) з масою тіла – 0,16-0,18 кг. Упродовж одного місяця до початку та під час експерименту тварини утримувалися у віварії за умов сталої температури (18-21 С), вологості повітря (50-55%) в окремих обмінних клітках з вільним доступом до питної води та їжі для адаптації до умов експерименту. Тварини були розділені на дві підгрупи: контрольну інтактні щури, (n=20) й дослідну (n=20) – щури з індукованим алоксановим ЦД (ЦД викликали

шляхом уведення 5% алоксан моногідрату внутрішньоочеревинно в дозі 150 мг/кг, у якості розчинника використано 0,09 % NaCl). Дослідження рівня базальної глікемії проводили за допомогою приладу «OneTouch» (виробник «Johnson&Johnson»), який становив $\geq 10,0$ ммоль/л при заборі крові з хвостової вени. Тварин забивали на 14 добу з моменту моделювання ЦД шляхом декапітації під легким ефірним наркозом у відповідності до етичних принципів щодо проведення експериментів згідно вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 1986). Матеріалом для дослідження була плазма крові.

Визначення концентрації основних біохімічних показників проводили в гепаринізованій плазмі без слідів гемолізу загальноприйнятими уніфікованими методиками. Концентрацію загального білка визначали біуретовим методом, альбуміну – з бромкрезоловим зеленим, глюкози – ферментативним глюкозооксидазним, сечовини – ферментативним уреазним, реактивами виробництва ПрАТ «Реагент» (м. Дніпропетровськ, Україна). Визначення концентрації креатиніну та активності ферментів класу трансфераз (АЛТ [2.6.1.2], АСТ [2.6.1.1], ГГТ [2.3.2.2]) проводили кінетичними спектрофотометричними методами аналізу з використанням оптичного тесту Варбурга, які розроблені у відповідності з рекомендаціями Міжнародної федерації Клінічної хімії (IFCC). Концентрацію креатиніну визначали модифікованим методом Яффе без депротейнізації за реакцією взаємодії пікратами натрію та креатиніном у лужному середовищі з утворенням похідного 2,4,6-тринітро-циклогексадієну. Визначення активності амінотрансфераз (АЛТ, АСТ) проводили кінетичним методом без піридоксаль-5-фосфата, що базується на різниці поглинання окисненої та відновленої форми НАД, активність ГГТ визначали за реакцією швидкості утворення 5-аміно-3-нітробензоата реагентами фірми «Cormay» (м. Ломянки, Польща). Вимірювання здійснювали на фотометрі «Solar» РМ-1111, біохімічному напівавтоматичному аналізаторі ВА-88 «Mindray». Для контролю правильності та достовірності результатів використовували контрольну сироватку «Cormay Serum HP» (REF 5-173; Lot 05-510F) для кожної серії вимірювань. Статистичну обробку, даних проводили за допомогою програм «Statistica 6» (Statsoft, США), аналіз результатів здійснено за допомогою t-критерія Стьюдента з поправкою на різницю дисперсій за критерієм U-Уілкоксона. Результати вважали значущими на рівні достовірності $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Результати проведених досліджень виявили виражену гіперглікемію, що коливалась в межах 11-20 ммоль/л у експериментальних тварин. Середня величина концентрації глюкози становила 12,6 ммоль/л, що було вдвічі вищим у порівнянні з аналогічним показником у групі контрольних тварин (табл. 1) та свідчило про розвиток алоксанового ЦД.

Таблиця 1

Середній вміст основних біохімічних показників у плазмі крові щурів за умов алоксанового ЦД (14 доба) (M±m)

Показники Групи тварин	Глюкоза ммоль/л	Заг. білок г/л	Альбумін г/л	Сечовина ммоль/л	Креатинін мкмоль/л	АЛТ У/л	АСТ У/л	ГГТ У/л
Контроль (n=20)	6,0±0,13	62,1±1,25	34,6±0,92	5,5 ± 0,23	55,6±0,21	56,2±0,25	128,1±0,12	32,3±0,12
Діабет (n=20)	12,6±1,28 **	51,1±0,85 *	31,8±0,65	4,1±0,04	53,3±0,13	76,8±0,14 *	235,4±0,11* *	58,1±0,15 **

Примітка: * – $p < 0,05$ та ** – $p < 0,01$ – вірогідність змін у порівнянні з контрольною групою

З огляду нашого експерименту, найбільш піковими були результати щодо зміни активності ферментів, які задіяні в обміні аміно- та кетокислот.

Величина активності АСТ достовірно зростала майже вдвічі за умов моделювання алоксанового діабету на відміну від контрольної групи тварин (в 1,8 рази); при цьому зміна активності АЛТ у плазмі дослідної групи було дещо нижчою – у 1,4 рази (табл. 1).

Підвищення активності АСТ з однієї сторони буде свідчити про некротичні процеси у гепатоцитах, а з іншої – можна припустити, що підвищення активності АСТ пов'язане або з необхідністю відведення продуктів гліколізу від органів, які знаходилися в умовах гіпоксії, або з підвищенням енергетичних витрат печінкою. Тобто, суттєве зростання активності АСТ в умовах нашого експерименту може свідчити про транзиторне ураження як підшлункової залози так і печінки. Відома безпосередня участь АСТ у трансмембранному переносі відновних потенціалів через мітохондріальну мембрану й регенерації НАДН, у цьому контексті підвищення активності АСТ свідчить не тільки про лізис клітин, а й про метаболічну гіперактивність для забезпечення необхідних біохімічних механізмів та фізіологічних функцій на тлі гострого періоду розвитку ЦД. ГГТ переважно локалізований у мітохондріях і мікросомах клітин підшлункової залози та

гепатоцитів, що дозволяє віднести діагностику даного ферменту до процесів ураження цих органів. За умов нашого експерименту спостерігалось достовірне зростання активності ГТТ у порівнянні з контрольною величиною на 79% (табл. 1).

Для оцінки функціонального стану організму є важливими не тільки дані щодо активності ферментів, а також коефіцієнт співвідношення їх активності, що дозволяє характеризувати ступінь ушкодження клітин (АЛТ як більш вірогідний цитоплазматичний маркер ушкодження, а АСТ та ГТТ – відповідно – як мітохондріальні).

За умов експерименту, на 14 добу з моменту введення алоксану, коефіцієнт де Рітиса (АСТ/АЛТ) зростав у 1,34 рази (таб. 2) у порівнянні з його показником щодо контрольної групи. Таке пікове зростання активності АСТ та гіперболізація коефіцієнта де Рітиса є маркером мітохондріальної дисфункції гепатоцитів та прояву гострих гепатотоксичних процесів на фоні розвитку алоксанового ЦД.

Високі значення коефіцієнту де Рітиса свідчать про активне включення субстратів у цикл трикарбонових кислот та генералізацію основного метаболічного шляху, при цьому загальні шляхи обміну вуглеводів сповільнюються, що призводить до їх поступового виснаження та дисбалансу. Це свідчить про стресовий характер впливу та перенавантаження центральних метаболічних шляхів для забезпечення життєдіяльності основних систем органів. Зміни в активності ферментів трансамінування свідчать про стан гомеостатичної функції печінки.

Таблиця 2

Порівняльна таблиця співвідношення активності ферментів у плазмі крові

Співвідношення активності ферментів	Контрольна група	Алоксановий діабет	Коефіцієнт зростання за умов ЦД/контроль
ГТТ/АлАт	0,57	0,75	1,31 *↑
ГТТ/АсАТ	0,24	0,25	1,04
АсАТ/АлАТ	2,27	3,06	1,34 *↑

Примітка: * – $p < 0,05$ – вірогідність зміни коефіцієнту.

За умов алоксанового діабету будуть відбуватися процеси активації окислювального стресу, провокуються зміни, що характерні для початкового гострого запального процесу ушкодження гепатоцитів. Приблизно однаково відбувається зростання активності АСТ та ГТТ, тому їх співвідношення з активністю АЛТ характеризується значним зростанням (табл. 2).

Децю знижений ріст активності АЛТ у порівнянні з попередніми ферментами, імовірно характеризує зміни щодо глюкозо-аланінового циклу, внаслідок активізації процесів гліюконеогенезу для забезпечення тканин енергією.

Показниками загальної інтоксикації організму також буде зниження білоксинтезуючої функції печінки. Адже концентрація загального білка крові експериментальних тварин достовірно знизилась ($p < 0,05$) на фоні порушення процесів трансамінування та метаболізму амінокислот, при відсутності достовірної зміни щодо концентрації альбуміну (таб 1). Такі зміни можуть свідчити про певний дисбаланс у синтезі глобулінової фракції та інформувати про перерозподіл вмісту багатьох гострофазових білків.

Нами не відмічена нефротоксична дія алоксану: показники концентрації сечовини та креатиніну залишалися без вірогідних змін при порівнянні контрольної та експериментальної груп на 14 добу моделювання захворювання. Окрім того, рівень креатиніну характеризувався достатньо низькою середньою величиною – 53,3 мкмоль/л, згідно нашої думки, при імовірній нефропатії, він мав сягати хоча б 75,0 мкмоль/л за умов відчутної гіпопротеїнемії (51,1г/л). На 14 добу моделювання алоксанового ЦД відсутні достовірні прояви вираженої інтоксикації з посиленням розпадом тканин та переважанням катаболічних процесів над анаболічними, підтвердженням чому є відсутність змін щодо зростання концентрації сечовини та креатиніну у плазмі крові.

Виразена недостатність інсуліну й гіперглікемія, які розвиваються за умов алоксанового діабету, здатні викликати комплекс метаболічних порушень у системі пішлункової залози та печінки, підтвердженням чого є достовірна, яскраво виражена, зміна в активності ферментів АлАТ, АсАТ, ГТТ на початковому етапі формування патологічних змін. Використання цих показників у клініці є загальнодоступними первинними маркерами ураження, а коефіцієнти співвідношення їх активності (АСТ/АЛТ та ГТТ/АЛТ) є важливими індикаторами пошкодження цих тканин.

Висновок

За умов модельованого алоксанового ЦД (14 доба) відбувається вірогідне зростання активності ферментів (АСТ, ГТТ, АЛТ), що є відображенням порушення клітинних метаболічних

процесів. Співвідношення активності таких ферментів як ГГТ/АЛТ та АСТ/АЛТ характеризують стан гострих патологічних процесів у печінці та є більш інформативними показниками, ніж концентрація загального білка, альбуміну, сечовини, креатиніну.

Перспективи подальших досліджень будуть стосуватися дослідження взаємозв'язку активності ферментів та концентрації гострофазових білків (С-реактивного протеїну, церулоплазміну, фібриногену, а-кислого глікопротеїну) за умов аллоксанового ЦД.

Список літератури

1. Barysheva E. V. Izmenenie pokazateley prooksidantno-antioksidantnoy sistemyi pri snizhenii kontsentratsii deyteriya v organizme laboratornykh zhivotnykh s alloksanovym diabetom. / E. V. Barysheva // Fundamentalnyie issledovaniya. – 2015. – No.1. – С. 457-461.
2. Mozheyko L. A. Eksperimentalnyie modeli dlya izucheniya saharnogo diabeta. Chast I. Alloksanovyyi diabet. / L. A. Mozheyko // Zhurn. Grodnen. gos. med. un-t. – 2013. – No. 3, T.43. – S. 26-29.
3. Palchikova N. A. Gormonalno-biohimicheskie osobennosti alloksanovoy i streptozototsinovoy modeley eksperimentalnogo diabeta. / N. A. Palchikova, N. V. Kuznetsova, O. I. Kuzminova [i dr.] // Byul. SO RAMN. – 2013 – No.6. – S. 18-24.
4. Telushkin P. K. Osobennosti azotistogo obmena i energoobespecheniya miokarda pri insulinovoy gipoglikemii u kryis. [Elektronniy resurs]: / P. K. Telushkin, A. Yu. Stelmah, N. B. Medvedeva [i dr.] // Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya. –2014. – No. 5. Rezhim dostupa: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=15112>
5. Tkachenko V. I. Analiz poshyrenosti ta zakhvoriuvanosti na tsukrovyyi diabet sered naseleennia svitu ta Ukrainy za 2003–2013 rr. / V. I. Tkachenko // Liky Ukrainy plius. – 2014. – No.4 (21). – S. 55-59.
6. Gati Mohannad Abdulrazzak Gati. Fizizologo-biohimicheskie aspekty adaptatsii kryis k usloviyam alloksanovogo diabeta / Gati Mohannad Abdulrazzak Gati, D. N. Fedorin, N. D. Polyakova-Semenova [et al.] // Fundamentalnyie issledovaniya. – 2013. – No.11(3). – С. 465-469.
7. Bukhari Syed Shahid Imran. Dose optimization of Alloxan for diabetes in albino mice / Bukhari Syed Shahid Imran, Abbasi Muddasir Hassan, Khan Muhammad Khalil Ahmad // Biologia (Pakistan). – 2015. – 61(2). – P. 301-305.
8. Chatzigeorgiou A. The Use of Animal Models in the Study of Diabetes Mellitus / A. Chatzigeorgiou, A. Halapas, K. Kalafatakis [et al.] // Internat. J. of Exper. and Clinic. Pathophys. And Drug Research. – 2009. – No.2. – Vol.23. – P. 245-258.
9. Lucchesi A. N. Diabetes mellitus triggers oxidative stress in the liver of alloxan treated rats: a mechanism for diabetic chronic liver disease / A. N. Lucchesi, N. Tavares de Freitas, L. L. Cassettari [et al.] // Acta Cir. Bras. – 2013 – 28(7), P. 502-508. DOI: 10.1590/S0102-86502013000700005
10. Mnafgui K. Inhibition of key enzymes related to diabetes and hypertension by Eugenol in vitro and in alloxan-induced diabetic rats. / K. Mnafgui, F. Kaanich, A. Derbali [et al.] // Archives of Physiology and Biochemistry. – 2013. – 119(5). – P.225-233.
11. Mohd Azam Hyder. Comparative Levels of ALT, AST, ALP and GGT in Liver associated Diseases. / Mohd Azam Hyder, Marghoob Hasan, Abdelmarouf Hassan Mohieldein // European Journal of Experimental Biology. – 2013. – No.3 (2). – P. 280-284.
12. Radenkovich M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art / M. Radenkovich, M. Stojanovich, M. Prostran // J. of Pharm. and Toxicol. Methods. – 2016. – No.78. – P.13-31.

Реферати

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ КЛАССА ТРАНСФЕРАЗ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ АЛЛОКСАНОВОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА У КРЫС

Геруш И. В., Чернюх О. Г., Дикал М. В.

В работе изучено содержание основных биохимических показателей плазмы крови нелинейных белых крыс на фоне индуцированного сахарного диабета (СД). Аллоксановый СД моделировали путем внутрибрюшинного введения 5 % раствора моногидрата аллоксана в расчете 150 мг/кг массы тела. На 14 сутки эксперимента изучены изменения показателей в сравнении с контрольными данными. Отмечено достоверное увеличение активности АСТ и ГГТ, соответственно на 84% ($p < 0,01$) и 79% ($p < 0,01$), при этом возрастание активности АЛТ было немногим меньше – на 36% ($p < 0,05$). Установлено, что на фоне существенной гипергликемии ($12,6 \pm 1,28$ ммоль/л) изменение активности ферментов является более чувствительным показателем острой фазы развития аллоксанового СД, чем такие общепринятые показатели как концентрация общего белка, альбумина, мочевины, креатинина. Кроме этого, коэффициенты соотношения активности ферментов могут указывать на некротические нарушения функционального состояния печени, как первичного органа, который отвечает за перестройку метаболических путей вследствие лизиса инсулин продуцирующих клеток.

Ключевые слова: аллоксановый сахарный диабет, плазма крови, биохимические показатели, белые крысы.

Статья надійшла 13.10.2017 р.

PECULIARITIES OF TRANSFERASE ENZYMATIC ACTIVITY CHANGES IN SIMULATING ALLOXAN-INDUCED DIABETES MELLITUS IN RATS

Gerush I. V., Cherniukh O. G., Dikal M. V.

A subject of study in this work is exploration of main biochemical indices of the blood plasma of albino rats with the background of induced diabetes mellitus (DM). Alloxan DM was modeled in rats by intraperitoneal injection of a 5% liquid of alloxan monohydrate in the dose of 150 mg/kg of body weight. On the 14th day of the experiment, the changes in the indices were compared with the control data. The results of our studies have found a pronounced hyperglycemia ranging within 11-20 mmol/L. An average glucose concentration was $12,6 \pm 1,28$ mmol/L that was twice as much as compared to the similar index in the group of control animals $6,0 \pm 0,13$ mmol/L. A significant increase in AST and GGT activity was observed, respectively, by 84% ($p < 0.01$) and 79% ($p < 0.01$), while the increase in ALT activity was slightly less – by 36% ($p < 0.05$). It has been established that against a background of significant hyperglycemia ($12,6 \pm 1,28$ mmol/L), the change in enzyme activity is a more sensitive indicator of the acute phase of alloxan DM development than such generally accepted indicators as the concentration of total protein, albumin, urea, creatinine. Furthermore, the enzyme activity ratios may indicate necrotic disorders of the functional state of the liver, as the primary organ responsible for rearranging the metabolic pathways due to the lysis of the insulin-producing cells.

Key words: alloxan's diabetes mellitus, blood plasma, biochemical indices, albino rats.

Рецензент Костенко В.О.