

УДК 577.124

Коррекция нарушений обмена углеводов при развитии инсулинорезистентности в эксперименте

О.М. Балаева-Тихомирова

*Учреждение образования «Витебский государственный
университет им. П.М. Машерова»*

В 1998 г. Американская диабетологическая ассоциация опубликовала определение понятия «инсулинорезистентность» (ИР), которое с тех пор остается общепризнанным. ИР рассматривается как нарушение биологического (метаболического и молекулярно-генетического) ответа на инсулин (экзогенный и эндогенный), нарушение метаболизма углеводов, жиров, белков, изменение синтеза ДНК, транскрипции генов. Наибольшее клиническое значение имеет потеря чувствительности к инсулину мышечной, жировой и печеночной тканей [1].

В настоящее время существуют нефармакологические и фармакологические методы коррекции ИР. К нефармакологическим методам относятся низкокалорийная диета и физические нагрузки. С конца 1950-х годов фармацевтическая промышленность всего мира работает над созданием препаратов, устраняющих ИР, повышающих чувствительность к инсулину, антиоксидантных средств, гепатопротекторов [2]. В связи с этим исследования, связанные с изучением особенностей метаболизма при развитии ИР и их профилактики, являются актуальными.

Начиная с 2005 г. на кафедре химии Витебского государственного университета им. П.М. Машерова проводятся исследования химического состава и биологического действия экстракта куколок дубового шелкопряда (ЭКДШ). Установлено, что ЭКДШ обладает антиоксидантным действием [3], снижает проявления стеатогепатоза при развитии ИР [4].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния ЭКДШ на активность ферментов обмена углеводов при моделировании ИР у крыс.

Материал и методы. Для воспроизведения ИР использовалось содержание животных на высокожировой диете (ВЖД) по Либеру-Де Карли (Liber-De

Адрес для корреспонденции: 210032, г. Витебск, ул. Чкалова, 43-2-103, тел.: 8(0222)25-30-25 – Балаева-Тихомирова О.М.

Carli). Для эксперимента использовали крыс-самок, находящихся перед этим на стандартном рационе вивария. После двухнедельной адаптации животные были введены в опыт и разделены на следующие пять групп: 1 группа – контроль вивария (интактные крысы) (n=10); 2 группа – воспроизведение ИР путем кормления животных ВЖД 2 месяца (n=10); 3 группа – воспроизведение ИР путем кормления животных ВЖД 3 месяца (n=10); 4 группа – воспроизведение ИР путем кормления животных ВЖД 3 месяца с введением водного ЭКДШ в дозе 7 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела внутривентрикулярно ежедневно в течение последнего месяца ВЖД (n=9); 5 группа – воспроизведение ИР путем кормления животных ВЖД 3 месяца с введением водного ЭКДШ в дозе 70 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела внутривентрикулярно ежедневно в течение последнего месяца ВЖД (n=10).

Содержание гликогена определяли по методу С.Р. Krisman [5], концентрацию глюкозы в крови – глюкозооксидазным методом с использованием набора фирмы «ДиаконДиасис». Активность ферментов углеводного обмена определяли в микросомально-цитоплазматической фракции полученной центрифугированием гомогенатов при 6000 об/мин. Гомогенаты готовили при 2–4°C на растворе, содержащем 0,05 М Трис-НСI, 0,15 М хлорид калия и 0,001 М ЭДТА (рН 7,8). В ткани печени определяли активность гексокиназы (ГК) (КФ 2.7.1.1), глюкокиназы (ГлК) (КФ 2.7.1.2) [6], глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) (КФ 1.1.1.49) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6-ФГДГ) (КФ 1.1.1.43) [7], фосфофруктокиназы (ФФК) (КФ 2.7.1.11) [8–9], альдолазы фруктозо-1,6-бисфосфата (КФ 4.1.2.6) (альдолаза Ф-1,6-БФ) [10], рибозо-5-фосфат метаболизирующих ферментов (Р-5-ФМФ) по убыли рибозо-5-фосфата [11–12], транскетолазы (ТК) по убыли седогептулозо-7-фосфата (КФ 2.2.1.1) [13–14], пируватдегидрогеназы (ПДГ) (КФ 1.2.4.1) и α -кетоглутаратдегидрогеназы (α -КГДГ) (КФ 1.2.4.2) [15], фосфорилазы гликогена (ФР гликогена) (КФ 2.4.1.1) [16], фосфоглюкомутазы (ФГМ) по убыли глюкозо-1-фосфата (КФ 2.7.5.1) [17], глюкозо-6-фосфатазы (Г-6-Фаза) (КФ 3.1.3.9) [18], фруктозо-1,6-бисфосфатазы (Ф-1,6-БФаза) (КФ 3.1.3.11) [19].

Результаты и их обсуждение. У животных, получавших ВЖД, наблюдалось достоверное увеличение концентрации глюкозы в сыворотке крови в 1,2 раза и 1,3 раза через 2 месяца и 3 месяца соответственно (табл. 1). Одной из причин гипергликемии при ИР является ускорение процесса гликогенолиза. Оценка уровня гликогена показала, что при моделировании ИР достоверно снижалась концентрация гликогена в печени животных (табл. 1).

Таблица 1
Содержание гликогена (мг/г) в печени и глюкозы (ммоль/л) в сыворотке крови крыс при моделировании ИР и применении ЭКДШ ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)

Показатели	Группы животных				
	1	2	3	4	5
Глюкоза	5,41±0,13	6,29±0,11 ¹	6,81±0,19 ¹	5,99±0,11 ^{1,3}	6,72±0,47 ¹
Гликоген	128,9±10,99	0,64±0,15 ¹	0,87±0,24 ¹	2,17±0,46 ^{1,2,3}	1,73±1,14 ¹

Примечание. Здесь и в последующих таблицах Р < 0,05: ¹ – по сравнению с группой 1; ² – по сравнению с группой 2; ³ – по сравнению с группой 3.

При введении ЭКДШ в дозе 7 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела в течение последнего месяца диеты отмечено снижение концентрации глюкозы в крови по сравнению с уровнем глюкозы животных, получавших ВЖД 3 месяца. При этой же дозе экстракта выявлено увеличение содержания гликогена в печени, которое хотя и оставалось сниженным по сравнению с контрольной группой, но достоверно увеличилось по сравнению с содержанием гликогена в печени крыс, которым препарат не вводился. При введении

препарата в дозе 70 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела аналогичного эффекта не наблюдалось.

Снижение концентрации гликогена в печени обусловлено увеличением активности ФР в 2,0 раза через 2 месяца диеты и в 2,4 раза через 3 месяца диеты (табл. 2). При введении ЭКДШ в обеих дозах активность ФР гликогена снижалась до значений интактных животных. Об активации процесса гликогенолиза свидетельствуют результаты исследования активности ФГМ (табл. 2). Установлено, что кормление животных ВЖД вызывает увеличение активности ФГМ в 1,7 и 6,1 раза через 2 месяца и 3 месяца ВЖД соответственно. Применение ЭКДШ нормализует активность фермента до значений интактных животных.

Снижение концентрации гликогена в печени может быть следствием уменьшения концентрации Г-6-Ф, который в норме активирует гликогенсинтазу и ингибирует ФР гликогена. На концентрацию Г-6-Ф влияют процессы фосфорилирования свободной глюкозы под действием ГК и ГлК и дефосфорилирования под действием Г-6-Фазы.

Таблица 2

**Активность ГК (мкмоль НАДФ·г⁻¹·ч⁻¹), ГлК (мкмоль НАДФ·г⁻¹·ч⁻¹),
ФГМ (мкмоль Рн·г⁻¹·мин⁻¹), ФР гликогена (мкмоль Рн·г⁻¹·мин⁻¹)
в печени крыс при моделировании ИР и применении ЭКДШ ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)**

Ферменты	Группы животных				
	1	2	3	4	5
ГК	38,65± 7,67	18,84± 4,17 ¹	21,39± 8,63 ¹	32,61± 4,18 ^{1,2,3}	36,00± 2,54 ^{2,3}
ГлК	14,42± 9,07	12,47± 5,52	4,45± 2,47 ¹	19,73± 6,36 ^{2,3}	5,47± 1,86 ^{1,2}
ФГМ	6,24± 1,16	3,69± 0,93 ¹	1,02± 0,27 ^{1,2}	6,28± 2,17 ^{2,3}	5,08± 2,28 ³
ФР гликогена	0,73± 0,67	1,49± 0,66 ¹	2,00± 1,02 ¹	0,82± 0,54 ^{2,3}	0,79± 0,23 ^{2,3}

При изучении активности ферментов ГК и ГлК установлено (табл. 2), что развитие ИР сопровождалось снижением активности обоих ферментов, причем снижение активности ГлК через 3 месяца кормления ВЖД выражено в большей степени, чем ГК. Это связано с тем, что активность ГлК, в отличие от ГК, регулируется инсулином. Снижение активности ГК может быть обусловлено уменьшением поступления глюкозы в печень.

Выявлен нормализующий эффект ЭКДШ на активность ГК в обеих дозах, на активность ГлК – только при дозе 7 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела.

Снижение активности ФФК и альдолазы Ф-1,6-БФ при развитии ИР свидетельствует об ингибировании гликолиза (табл. 3). Применение ЭКДШ в обеих дозах достоверно увеличило активность данных ферментов по сравнению с активностью ферментов у животных, кормленных ВДЖ, но не до уровня интактных животных.

Однако у животных, кормленных ВЖД в течение 3-х месяцев, обнаружено повышение активности ПДГ, что, возможно, вызывает накопление ацетил-КоА, используемого для синтеза жирных кислот и триацилглицеролов, обуславливающих развитие стеатогепатоза при ИР [20]. Следствием снижения уровня пирувата при ингибировании гликолиза может быть дефицит щавелевоуксусной кислоты, образующейся при карбоксилировании пирувата. Это приводит к уменьшению функционирования ЦТК и подтверждается снижением активности α-КГДГ при развитии ИР. Выявлен нормализующий эффект ЭКДШ в обеих дозах на активность ПДГ и в дозе 7 мкг свободных аминокислот на 100 г массы тела на активность α-КГДГ.

Таблица 3

Активность ФФК (мкмоль диоксиацетонфосфата·г⁻¹·мин⁻¹), альдолазы Ф-1,6-БФ (мкмоль диоксиацетонфосфата·г⁻¹·мин⁻¹), ПДГ (ммкмоль феррицианида·г⁻¹·мин⁻¹), α-КГДГ (ммкмоль феррицианида·г⁻¹·мин⁻¹) в печени крыс при моделировании ИР и применении ЭКДШ ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)

Ферменты	Группы животных				
	1	2	3	4	5
ФФК	29,21± 5,47	8,13± 2,39 ¹	6,19± 0,84 ^{1,2}	8,47± 1,42 ^{1,3}	7,97± 1,85 ^{1,3}
Альдолаза Ф-1,6-БФ	114,21± 35,59	38,13± 16,57 ¹	47,04± 9,06 ¹	73,83± 34,55 ^{1,2,3}	87,72± 38,55 ^{2,3}
ПДГ	143,22± 63,65	133,53± 31,88	270,33± 52,21 ¹	153,24± 76,46 ³	195,31± 92,78 ³
α-КГДГ	193,42± 66,02	99,83± 48,92 ¹	118,17± 37,56 ¹	145,11± 65,05 ³	110,57± 33,27 ¹

Известно, что развитие ИР приводит к активации процесса глюконеогенеза из аминокислот, высвобождающихся при распаде белков периферических тканей. Изучение активности ключевых ферментов глюконеогенеза показало, что при кормлении животных ВЖД в течении 3-х месяцев достоверно увеличивается активность фруктозо-1,6-бисфосфатазы и глюкозо-6-фосфатазы в 2,8 и 2,4 раза соответственно (табл. 4). Применение ЭКДШ нормализовало активность данных ферментов в обеих применяемых дозах до значений интактных животных. Активация Г-6-Фазы при развитии ИР приводит к образованию свободной глюкозы, которая поступает в кровь, усиливая гипергликемию.

Таблица 4

Активность Ф-1,6-БФазы (мкмоль Рн·г⁻¹·мин⁻¹), Г-6-Фазы (мкмоль Рн·г⁻¹·мин⁻¹) в печени крыс при моделировании ИР и применении ЭКДШ ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)

Ферменты	Группы животных				
	1	2	3	4	5
Ф-1,6-БФаза	1,31± 0,21	1,15± 0,27	3,71± 0,96 ¹	1,51± 0,47 ³	1,22± 0,38 ³
Г-6-Фаза	0,58± 0,25	1,25± 0,81	1,39± 0,46 ¹	0,76± 0,19 ³	0,77± 0,49 ³

Инсулин стимулирует интенсивность пентозофосфатного пути распада глюкозы за счет индукции синтеза Г-6-ФДГ. Как следует из табл. 5, при развитии ИР отмечалось снижение активности Г-6-ФДГ и 6-ФГДГ, в результате действия которых образуется НАДФН, необходимый для синтеза холестерина и высших жирных кислот. Возможно, это позволяет сберечь Г-6-Ф для процесса гликолиза. Применение ЭКДШ не изменило активность исследуемых ферментов. При кормлении животных ВЖД в течение 2-х месяцев снижалась активность Р-5-ФМФ в 1,6 раза и не изменялась активность ТК. Через 3 месяца диеты отмечено увеличение активности Р-5-ФМФ и ТК в 1,5 и 2,1 раза соответственно. Активация неокислительной ветви пентозофосфатного пути при развитии ИР может являться дополнительным источником глицеральдегид-3-фосфата, используемого в гликолизе. ЭКДШ в обеих применяемых дозах оказывал нормализующее влияние на активность Р-5-ФМФ и ТК в печени крыс.

Таблица 5

Активность ТК (мкмоль седогептулозо-7-фосфата·г⁻¹·мин⁻¹), Р-5-ФМФ (мкмоль рибозо-5-фосфата·г⁻¹·мин⁻¹), Г-6-ФДГ, 6-ФГДГ (мкмоль НАДФ·г⁻¹·ч⁻¹) в печени крыс при моделировании ИР и применении ЭКДШ ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)

Ферменты	Группы животных				
	1	2	3	4	5
Г-6-ФДГ	163,7± 60,6	51,52± 22,7 ¹	47,23± 35,3 ¹	37,38± 18,8 ¹	48,80± 34,8 ¹
6-ФГДГ	156,9± 28,3	114,1± 31,6 ¹	78,1± 21,8 ¹	86,4 ± 39,4 ¹	91,2 ± 24,0 ¹
Р-5-ФМФ	4,04± 1,59	2,46± 0,81 ^{1,3}	6,02± 1,47 ^{1,3}	4,59± 1,19 ^{2,3}	3,14± 1,43 ³
ТК	2,32± 0,82	2,65± 0,96	4,93± 1,68 ¹	3,00± 0,50 ³	2,31± 0,97 ³

Заключение. Таким образом, полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

1) высокожировая диета вызывает развитие ИР, что сопровождается нарушением активности ферментов обмена углеводов – снижением активности ферментов гликолиза и окислительной ветви пентозофосфатного пути и повышением активности ферментов гликогенолиза, глюконеогенеза и неокислительной ветви пентозофосфатного пути;

2) ЭКДШ в дозах 7 и 70 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела способствует нормализации активности ферментов гликолиза, глюконеогенеза, пируватдегидрогеназы и α-кетоглутаратдегидрогеназы, неокислительной ветви пентозофосфатного пути и не влияет на активность ферментов окислительной ветви пентозофосфатного пути;

3) механизм позитивного эффекта ЭКДШ в дозе 70 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела может быть обусловлен антиоксидантным действием и дополнительным поступлением субстратов метаболизма – аминокислот и витаминов. При малой дозе (7 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела) действие возможно связано с взаимодействием компонентов экстракта со специфическими участками мембран и изменением физико-химических свойств воды [21].

ЛИТЕРАТУРА

1. **Ожирение: этиология, патогенез. Клинические аспекты** / под ред. И.И. Дедова, Г.А. Мельниченко. – М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – С. 44–62.
2. **Kadayifci, A.** Medical treatment of non-alcoholic steatohepatitis / A. Kadayifci, R.B. Merriman, N.M. Bass // Clinics in Liver Disease, 2007. – Vol. 11, № 1. – P. 119–140.
3. **Чиркин, А.А.** Антиоксидантная активность куколок китайского дубового шелкопряда / А.А. Чиркин, Е.И. Коваленко, В.М. Шейбак // Ученые записки «УО ВГУ им. П.М. Машерова». – 2007. – Т. 6. – С. 247–265.
4. **Балаева-Тихомирова, О.М.** Эффект водного экстракта куколок дубового шелкопряда на обмен липидов при моделировании инсулинорезистентности у крыс / О.М. Балаева-Тихомирова, Л.А. Крумплевская // Юбилейная научно-практическая конференция, 11 июня 2009 г. – Гомель: ГГУ им. Ф. Скарыны, 2009. – С. 217–218.
5. **Krisman, C.R.** A method for the colometric estimation of glycogen with iodine / C.R. Krisman // Anal. Biochem. – 1962. – Vol. 4. – P. 17–23.
6. **Salas, M.** Insulin-dependent synthesis of liver glukokinase in the rat / M. Salas [et al.] // J. Biol. Chem. – 1963. – Vol. 238, № 11. – P. 3535–3538.

7. **Захарьин, Ю.Л.** Метод определения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы / Ю.Л. Захарьин // Лаб. дело. – 1967. – № 6. – С. 327–330.
8. **Куликова, А.И.** Активность фосфофруктокиназы скелетных мышц и сердца крыс при гемической гипоксии / А.И. Куликова // Вопр. мед. химии. – 1966. – Т. 12, № 2. – С. 196–199.
9. **Racker, E.** Spectrophotometric measurement of hexokinase and phosphohexokinase activity / E. Racker // J. Biol. Chem. – 1947. – Vol. 167, № 3. – P. 843–853.
10. **Товарницкий, В.И.** Метод определения альдолазы в сыворотке крови / В.И. Товарницкий // Современные методы в биохимии. «Медицина». – М., 1964. – Т. 1. – С. 303–310.
11. **Каразе, А.М.** Влияние инсулина на активность транскетолазы и трансальдолазы в печени крыс / А.М. Каразе [и др.] // Биохимия. – 1973. – Т. 38, № 3. – С. 515–519.
12. **Шатинскене, Р.-М.Р.** Влияние тироксина на ферменты пентозо-фосфатного пути обмена углеводов в сердечной мышце / Р.-М.Р. Шатинскене, А.И. Колотилова // Вопр. мед. химии. – 1970. – Т. 16, № 5. – С. 491–498.
13. **Головацкий, И.Д.** Мікрометод одночасного визначення гептулози і пентоз та деякі особливості обміну цих сполук в тканинах тварин / И.Д. Головацкий // Укр. біохім. журн. – 1965. – № 6. – С. 927–934.
14. **Bruns, F.N.** Über den Stoffwechsel von Ribose-5-phosphat in Hämolyisaten. III. Quantitative Bestimmung von Sedoheptulose-7-phosphat und einige Eigenschaften der Transketolase der Erythrozyten und des Blutserums / F.N. Bruns // Biochem. Ztschr. – 1958. – Vol. 330. – P. 497–508.
15. **Gubler, C.J.** Studies on the physiological functions of thiamine. I. The effects thiamine deficiency and thiamine antagonists on the oxidation of α -keto acids by rat tissues / C.J. Gubler // J. Biol. Chem. – 1961. – Vol. 236, № 12. – P. 3112–3120.
16. **Балаба, Т.Я.** Влияние амитал-натрия на активность фосфорилазы мышечной ткани при местной ишемии / Т.Я. Балаба // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1960. – Т. 50, № 9. – С. 85–89.
17. **Najjar, V.A.** The isolation and properties of phosphoglucomutase / V.A. Najjar // J. Biol. Chem. – 1948. – Vol. 175, № 1. – P. 281–290.
18. **Harper, A.E.** Hormonal factors affecting glucose-6-phosphatase activity. I. Effect of hypophysectomy and replacement therapy in the rat / A.E. Harper, F.G. Young // Biochem. J. – 1959. – Vol. 71, № 4. – P. 696–701.
19. **Weber, G.** Fructose-1,6-diphosphatase and lactic dehydrogenase activity in hepatoma and in control human and animal tissues / G. Weber, A. Cantero // Cancer Res. – 1959. – Vol. 19, № 7. – P. 763–768.
20. **Fabbrini, E.** Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease / E. Fabbrini [et al.] // Gastroenterology. – 2008. – Vol. 134, № 2. – P. 424–431.
21. **Пальмина, Н.П.** Механизм действия сверхмалых доз / Н.П. Пальмина // Химия и жизнь. XXI век. – 2009. – № 2. – С. 10–13.

S U M M A R Y

The researches of enzyme activity of carbohydrate metabolism were carried out in the course of experiment by modeling insulin resistance. It is established that the development of insulin resistance was accompanied by the decrease of glycolysis enzymes activity and oxidative branch of pentose phosphate pathway and the increase of activity of glucogenolysis, gluconeogenesis and non-oxidative branch of pentose phosphate pathway enzymes. The extract of an oak silkworm pupae in doses 7 and 70 mkg of free aminoacids/100 g weight of a body promotes normalization of the enzymes activity of glycolysis, gluconeogenesis, pyruvate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase, non-oxidative branch of pentose phosphate pathway and does not influence the activity of enzyme of oxidative branch of pentose phosphate pathway. The mechanism of the positive effect of the extract of an oak silkworm pupae in dose 70 mkg of free amino acids/100 g weight of a body can be associated with the antioxidative effect and additional receipt substrates of metabolism – aminoacids and vitamins. The small dose (7 mkg of free amino acids/100 g weight of a body) action is probably connected with the interaction components of the extract of an oak silkworm pupae with the specific sites of membrane and the change of physical and chemical properties of water.

Поступила в редакцию 10.02.2010