

ВЛИЯНИЕ ПИНЕАЛОНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ПРО- И АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ У КРЫС В МОДЕЛИ САХАРНОГО ДИАБЕТА

¹Фоменко М.П., ²Менджерский А.М., ¹Карантыш Г.В.

¹Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

²Донской государственной технической университет, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Аннотация. В статье приведен анализ влияния пинеалона на свободнорадикальные процессы и уровень экспрессии генов SOD1, GPX4 и GSR в гиппокампе крыс в модели индуцированного стрептозотоцином диабета (сахарный диабет I типа). Установлено, что при моделировании сахарного диабета в гиппокампе наблюдается интенсификация свободнорадикальных процессов: повышается уровень прооксидантов, снижается уровень антиоксидантов, а также уровень экспрессии генов антиоксидантов. При введении пинеалона в дозировках 50 или 100 нг/кг в модели сахарного диабета про-антиоксидантный баланс смещается в сторону снижения выработки свободных радикалов и возрастания антиоксидантной защиты. Более эффективен пинеалон в дозировка 100 нг/кг.

Ключевые слова. Модель стрептозотоцинового диабета, свободнорадикальные процессы, экспрессия генов SOD1, GPX4 и GSR гиппокампа.

INFLUENCE OF PINEALON ON EXPRESSION OF GENES OF PRO- AND ANTIOXIDANT ENZYMES AND FREE RADICAL PROCESSES IN RATS IN THE MODEL OF SUGAR DIABETES

¹Fomenko M.P., ²Menzheritsky A.M., ¹Karantysh G.V.

¹Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russian Federation

²Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Annotation. The article presents an analysis of the effect of pinealon on free radical processes and the level of expression of the SOD1, GPX4 and GSR genes in the rat hippocampus in a model of streptozotocin-induced diabetes (type I diabetes mellitus). It has been established that when modeling diabetes in the hippocampus, intensification of radically radical processes is observed: the level of prooxidants increases, the level of antioxidants decreases, as well as the level of expression of antioxidant genes. With the introduction of pinealone in dosages of 50 or 100 ng/kg in the model of diabetes mellitus, the pro-antioxidant balance shifts towards a decrease in the production of free radicals and an increase in antioxidant protection. Pinealon at a dosage of 100 ng/kg is more effective.

Keywords. Model of streptozotocin diabetes, free radical processes, expression of the SOD1, GPX4 and GSR hippocampal genes.

В настоящее время достигнуты большие успехи в диагностике и лечении сахарного диабета [1]. Тем не менее, в связи с ростом заболеваемости СД актуальность поиска адекватной терапии сахарного диабета не снижается. Важное значение в патогенезе сахарного диабета играет окислительный стресс, запускающий каскад реакций, направленных на развитие микроангиопатий [2]. В связи с этим использование препаратов в рамках сопутствующей терапии сахарного диабета, регулирующих интенсивность свободнорадикальных процессов, является перспективным. Особое внимание в последние годы стали также уделять роли инсулина в мозге. Инсулин может оказывать влияние на уровень глутатиона, а также экспрессию генов, кодирующих белки, участвующие в регуляции свободнорадикальных процессов в клетках мозга [3].

Целью данного исследования было сравнение влияния введения пинеалона в разных дозировках на свободнорадикальные процессы и уровень экспрессии генов SOD1, GPX4 и GSR в гиппокампе крыс в модели стрептозотоцинового диабета.

Методы исследования. Эксперименты на животных выполнены с соблюдением принципов Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.). Эксперимент проведен на беспородных белых крысах-самцах весом 200-250 г. Крыс делили на группы: 1 – контроль (n=16); 2 - группа животных (n=16), которым моделировали стрептозотоциновый диабет (СД); 3 – введение пинеалона в дозировках 50 (П50) или 100 нг/кг веса (П100) в течение 5-ти дней (n=36); 4 - группа животных, которым

моделировали СД и вводили пинеалон дозировках 50 (СД+П50) или 100 нг/кг веса (СД+П100) в течение 5-ти дней (n=36).

В работе использовали пептид пинеалон (Glu-Asp-Arg), содержащий глутаминовую, аспарагиновую кислоты и аргинин; способен стимулировать функциональную активность основных клеточных элементов ткани мозга, снижать уровень спонтанной гибели клеток, усиливать регенераторноадаптационные процессы в клетках [4].

Экспериментальный диабет вызывали (на 4-й день эксперимента) путем однократного введения крысам раствора стрептозотоцина (Sigma) в 0,4 мл цитратного буфера в дозе 50 мг/кг массы тела после 18-часового голодания. На 21 сутки после введения стрептозотоцина проводили декапитацию и в крови определяли уровень гликозилированного гемоглобина (HbA1) с использованием анализатора DS5 Glycomat (Великобритания) для подтверждения развития СД. Оценку показателей H2O2-индуцированной люминол-зависимой хемилюминисценции (светосуммы - Sm; высоты быстрой вспышки - H) в плазме крови животных осуществляли в течение 10 сек. на анализаторе AutoLuman Plus LB 953 фирмы Berhold Technologies (Германия). Относительный уровень транскриптов изучаемых генов исследовали с использованием метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) после обратной транскрипции. Образцы гиппокампа крыс мгновенно замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C. Тотальную РНК из тканей коры и гиппокампа выделяли при помощи набора Augum Total RNA fatty and fibrous tissue kit (BioRad). Количество и чистоту выделенной РНК оценивали спектрофотометрически на приборе NanoPhotometer (Implen). Тотальную РНК (0,5 мкг) подвергали обратной транскрипции в кДНК, которую проводили с использованием реагентов фирмы Евроген (Россия). Дизайн прямых и обратных праймеров для проведения ПЦР-РВ проводили в программе Primer3 с последующей проверкой в IDT. Праймеры были синтезированы фирмой Синтол (Россия). Последовательности праймеров приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Последовательности праймеров

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	t° плавления
SOD1	Gcg-gat-gaa-gag-agg-cat-gtt	Acg-gcc-aat-gat-gga-atg-ct	60
GPX4	Tga-gcc-gct-tat-tga-agc-ca	Cac-acg-caa-ccc-ctg-tac-tt	60
GSR	Gcc-ttc-acc-ccg-atg-tat-ca	Gcc-aac-cac-ctt-ctc-ctc-ttt	60
HPRT1 (референтный ген)	Tcc-tcc-tca-gac-cgc-ttt-tc	Atc-act-aat-cac-gac-gct-ggg	60

ПЦР-РВ была проведена на амплификаторе CFX-96 фирмы Bio-Rad. Расчет относительной экспрессии проводили, оценивая величины Ct (Threshold cycle), получаемые в ходе проведения ПЦР-РВ. Далее сравнивали уровни экспрессии исследуемых генов в опытных и контрольных образцах с использованием метода 2-ΔΔCt [5]. Проверку на нормальность распределения экспериментальных данных проводили с использованием критерия Колмагорова-Смирнова. Статистическую обработку результатов исследования проводили в программе Statistica 10.0 с использованием критериев Колмагорова-Смирнова и Ливиня, а также однофакторного дисперсионного анализа ANOVA.

Результаты исследования. В гиппокампе у крыс в модели стрептозотоцинового диабета выявлено возрастание светосуммы (+19%; $p < 0,05$) и высоты быстрой вспышки (+26%; $p < 0,05$). Известно, что светосумма является показателем расходования свободных радикалов липидной природы, что определяется уровнем прооксидантов в исследуемой системе. Амплитуда быстрой вспышки отражает устойчивость клеток/тканей к окислительным процессам и пропорциональна содержанию антиоксидантов. Таким образом, в модели сахарного диабета наблюдали возрастание интенсивности прооксидантной составляющей СРП. На этом фоне установлено выраженное снижение уровня экспрессии генов антиоксидантных ферментов относительно контроля: SOD1 ($p < 0,001$), GPX4 ($p < 0,0001$) и GSR ($p < 0,0001$).

Изменений показателей хемилюминисценции в гиппокампе при введении пинеалона в разных дозировках не наблюдали. Однако при введении пинеалона в дозировке 100 нг/кг происходило снижение уровня экспрессии гена SOD1 ($p < 0,05$), а также возрастание уровня экспрессии гена GPX4 ($p < 0,05$) относительно контроля; при введении пинеалона в дозировке 50 нг/кг наблюдали возрастание уровней экспрессии генов GPX4 и GSR ($p < 0,05$). Таким образом, при введении пинеалона в разных дозировках наблюдаются определенные перестройки в системе антиоксидантной защиты, что не сопровождается повышением прооксидантной активности в гиппокампе животных.

При моделировании СД и введении пинеалона в дозировке 50 нг/кг было установлено возрастание высоты быстрой вспышки на 27% ($p < 0,05$), снижение уровня экспрессии SOD1 ($p < 0,05$) и

GSR ($p < 0,05$) относительно контрольной группы. Тогда как в модели СД+П100 изменений показателей хемилюминисценции и уровня экспрессии исследуемых генов не было установлено.

Таким образом, в модели стрептозотоцинового диабета введение пептидного препарата пинеалона влияет на свободнорадикальные процессы. Вероятно, данный эффект проявляется через его воздействие на экспрессию генов белков, участвующих в СРП. При этом препарат оказывает дозозависимое влияние на показатели свободнорадикальных процессов. Более эффективным против развития окислительного стресса в условиях развития стрептозотоцинового диабета является введение пинеалона в дозировке 100 нг/кг животного.

Список использованных источников

1. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats / C.S. Macedo [et al.] // *Plasticsurgery, laboratory of plastic surgery: Sao Paulo – Paulista School of Medicine*, 2005. – P. 2-5.
2. Role of vascular oxidative stress in obesity and metabolic syndrome / J.-Y. Youn [et al.] // *Diabetes*, 2014. – Vol. 63, № 7. – P. 2344-2355.
3. Activation of promoter activity of the catalytic subunit of gamma-glutamylcysteine ligase (GCL) in brain endothelial cells by insulin requires antioxidant response element 4 and altered glycemic status: implication for GCL expression and GSH synthesis / J.W. Langston [et al.] // *Free Radic Biol Med.* – 2011. - Vol. 51. – P. 1749-1757.
4. Регуляция содержания цитокинов в сыворотке крови и активности каспазы - 3 в мозгу старых крыс кортексином и пинеалоном в модели острой гипоксической гипоксии / А.М. Менджерицкий [и др.] // *Успехи геронтологии.* - 2014. - Т. 27, № 1. - С. 94–97.
5. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method / K.J. Livak [et al.] // *Methods.* – 2001. – Vol. 25. – P.402–408.