

9. Саркисов Д. С. Очерки по структурным основам гомеостаза. — М., 1977.
10. Сергеев П. В., Галенко-Ярошевский П. А., Шимановский Н. Л. Очерки биохимической фармакологии. — М., 1996.
11. Усынин И. Ф. Новые методы научных исследований в клинической и экспериментальной медицине. — Новосибирск, 1980. — С. 96—98.
12. Юдаев Н. А., Афиногенова С. А., Крехова М. А. Биохимия гормонов и гормональной регуляции. — М., 1976.
13. Berry M. N., Friend D. S. // J. Cell Biol. — 1969. — Vol. 43. — P. 506—519.
14. Gendimenico G. J., Bouquin P. L., Trampusch K. M. // Anal. Biochem. — 1988. — Vol. 173. — P. 45—48.
15. Hatch F. T., Lees R. S. // Advanc. Lipid. Res. — 1968. — Vol. 6. — P. 2—68.
16. Knook D. L., Sleyster E. Ch. // Exp. Cell Res. — 1976. — Vol. 99. — P. 444—449.
17. Lowry O. H., Rosebrough N. G., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
18. Nabors D. J., Berliner D. L., Dougherty T. F. // J. Reticuloend. Soc. — 1967. — Vol. 4. — P. 237—253.

Поступила 27.07.01

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2002

УДК 615.31:546.47].03:616.379-008.64].015.4.076.9

А. А. Самигжонов, М. Ж. Эргашева, Т. С. Саатов

ВЛИЯНИЕ КООРДИНАЦИОННОГО СОЕДИНЕНИЯ ЦИНКА НА ПОГЛОЩЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ И АКТИВНОСТЬ ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ТКАНЕЙ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Институт биохимии АН Республики Узбекистан, Ташкент

Изучено влияние соединения цинка на процесс транспорта глюкозы через мембрану и активность пируватдегидрогеназы митохондрий сердца и скелетных мышц крыс с экспериментальным сахарным диабетом.

Объектом исследований явились диафрагма, митохондрии сердца, скелетных мышц крыс.

Целью работы было изучение влияния координационного соединения цинка—пирацина на транспорт глюкозы в диафрагме и на активность пируватдегидрогеназы сердца и скелетных мышц крыс с экспериментальным сахарным диабетом.

Экспериментальный сахарный диабет вызывали внутрибрюшинным введением аллоксана гидрата на фоне голодания.

В результате исследований установлено, что пирацин оказывает стимулирующее влияние на транспорт глюкозы в условиях экспериментального диабета. Под действием координационного соединения цинка наблюдалось повышение сниженной при диабете активности пируватдегидрогеназы.

Полученные результаты еще раз подтверждают роль ионов цинка в процессе транспорта и окисления глюкозы.

Zinc compounds were examined for their effects on the transport of glucose through the membrane and on the activity of pyruvate dehydrogenase of mitochondria of the hearts and skeletal muscles from rats with experimental diabetes mellitus. The objects of the investigations were the rat diaphragm, cardiac and skeletal muscle mitochondria.

The aim of the investigation was to study the effect of the coordination zinc compound piracine on the transport of glucose in the diaphragm and on the activity of pyruvate dehydrogenase of the hearts and skeletal muscles from rats with experimental diabetes mellitus.

Experimental diabetes mellitus was induced by intraperitoneal alloxan hydrate during fasting.

The investigation established that piracine exerted a stimulating effect on glucose transport in experimental diabetes. With the coordination zinc compound, there was an increase in the activity of pyruvate dehydrogenase, which is lowered in diabetes.

The findings provide again evidence for the role of zinc ions in glucose transport and oxidation.

Важность роли микроэлементов, в частности цинка, в физиологических процессах известна давно. Наряду с выполнением других функций ионы цинка могут участвовать в регуляции метаболизма глюкозы инсулином. Высказывается мнение о том, что влияние ионов цинка на метаболизм глюкозы обусловлено его воздействием не только на синтез и секрецию инсулина [9], но и на транспорт глюкозы. Обнаружено, что ионы цинка имитируют ряд эффектов инсулина: стимулируют транспорт и окисление глюкозы и ее превращение в глицериды с ингибированием липолиза [7]. Существует синергизм между инсулином и ионами цинка при стимуляции липогенеза из углеводов [3]. Установлено также, что ионы цинка повышают связывание инсулина с гепатоцитами [8]. Все эти данные указывают на то, что, кроме структурной роли в формировании запасной формы инсулина, ионы цинка причастны к механизму действия инсулина на транспорт глюкозы.

Целью настоящего исследования было изучение влияния координационного соединения цинка — пирацина на процесс поглощения глюкозы в диафрагме крыс, а также на активность пируватдегидрогеназы (ПДК) — ключевого фермента метаболизма углеводов.

Активность ПДК изучали в сердце и скелетных мышцах крыс в норме, при экспериментальном диабете, а также при действии координационного соединения цинка — пирацина.

Материалы и методы

Опыты проводили на крысах-самцах массой тела 130–200 г. Экспериментальный сахарный диабет вызывали внутрибрюшинным введением аллоксана гидрата в дозе 15 мг на 100 г массы тела животных на фоне голодания в течение 24 ч.

Лечение крыс с экспериментальным сахарным диабетом проводили внутрибрюшинным введением раствора пирацина в дозе 1 мг/мл на 100 г массы тела животных. Пирацин вводили животным в течение 14 дней.

Животных декапитировали под общим эфирным наркозом. После декапитации быстро вырезали диафрагму, промывали средой инкубации, состоящей из бикарбонатного буфера Кребса—Рингера (рН 7,4), 3% бычьего сывороточного альбумина, при 0°C, помещали в сосуды Варбурга, содержащие 2 мл среды инкубации и 0,5 кБк ¹⁴C-D-глюкозы. Опыты проводили с добавлением и без добавления раствора пирацина в инкубационную среду. Инкубацию проводили в течение 120 мин при 37°C в аппарате Варбурга. Образующийся CO₂ поглощали 10% раствором КОН. По окончании инкубации через пробирку с помощью иглы в сосуды впрыскивали 0,2 мл 2 М H₂SO₄, перемешивали и оставляли на 60 мин, КОН количественно переносили во флаконы со сцинтиллятором ЖС-8. Радиоактивность определяли на счетчике "Rackbeta" (LKB, Швеция).

В митохондриях изучали активность ПДК [1].

Митохондрии выделяли из исследуемой ткани в 0,01 М фосфатном буфере с помощью дифференциального центрифугиро-

вания. Для анализа брали навеску ткани около 1 г и гомогенизировали в 4-кратном объеме буфера. Осадок митохондрий подвергали трехкратному замораживанию-оттаиванию для того, чтобы разрушить субклеточные частицы и обеспечить максимальную доступность субстрата кофакторов для фермента. После окончания этой процедуры пробы центрифугировали 25 мин при 18 000–20 000 g.

Для проведения ферментативной реакции в кювету спектрофотометра шириной 1 см наливали 1,8 мл инкубационной среды, добавляли 0,1 мл митохондриального препарата, размешивали и устанавливали шель прибора. Реакцию начинали внесением в кювету 0,1 мл раствора коэнзима А. Изменение оптической плотности пробы, вызванное образованием восстановленной формы НАД, регистрировали при длине волны 340 нм через каждые 15 с в течение 2 мин.

Результаты и их обсуждение

Результаты изучения влияния препаратов цинка на поглощение глюкозы диафрагмой представлены в табл. 1. Как видно из представленных данных, препараты цинка в норме оказывают стимулирующее влияние на поглощение глюкозы диафрагмой. Под действием пирацина поглощение глюкозы стимулируется на 53%.

Полученные нами данные показывают, что под действием пирацина происходит также стимуляция транспорта глюкозы диафрагмой крыс с аллоксановым диабетом. При этом обнаружено, что добавление пирацина в инкубационную среду способствует стимуляции поглощения глюкозы на 33% по сравнению с контролем.

Стимуляция транспорта глюкозы под действием пирацина при диабете, возможно, объясняется повышением метаболизма глюкозы в диафрагме ионами цинка. Этот вывод сделан на основании того, что под действием ионов цинка происходит стимуляция окисления глюкозы [8]. Установлено, что значительное влияние ионов цинка на окисление глюкозы сохраняется даже тогда, когда облегченный транспорт глюкозы блокируется цитохалазином В. Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что длительное введение пирацина экспериментальным животным способствует восстановлению сниженной при диабете способности диафрагмы поглощать глюкозу.

Полученные данные, видимо, объясняются восстанавливающим действием препаратов цинка на процесс транспорта глюкозы через мембрану.

Известно, что развитие сахарного диабета сопровождается изменениями структурно-функциональных показателей плазматических мембран мышечных волокон экспериментальных животных. Это позволяет рассматривать нарушение мембранной структуры как один из первичных механизмов, участвующих в формировании метаболических сдвигов в организме и развитии диабетических осложнений.

Кроме того, хорошо известна роль перекисного окисления липидов в развитии патологического процесса в клетке. Перекисное окисление липидов играет важную роль в регуляции проницаемости клеточных мембран, состоянии окислительного фосфорилирования клетки. В нормальной ткани постоянно протекает процесс липидной перекисидации, интенсивность которого находится в обратной зависимости от активности естественных антиоксидантных систем. Избыточное образование активных форм кислорода может быть причиной повреждения и гибели клеток. Известно, что усиление перекисного окисления липидов имеет место при различных патологических состояниях.

Таблица 1

Влияние пирацина на поглощение глюкозы диафрагмой крыс в норме и при диабете ($M \pm m$; $n = 6$)

Группа животных	Поглощение глюкозы, мкмоль на 1 г сырой массы	
	контроль	пирацин
Интактные	$10,3 \pm 0,45$	$15,6 \pm 0,61$
Диабет	$7,6 \pm 0,51$	$10,1 \pm 0,43$
После лечения пирацином	$9,2 \pm 0,32$	

Примечание. Различия между контролем и опытом достоверны при $p = 0,01–0,001$.

Таблица 2

Активность ПДК в норме, при экспериментальном сахарном диабете и при введении пирацина животным с экспериментальным сахарным диабетом ($M \pm m$; $n = 6$)

Группа животных	Активность фермента, мкмоль НАДН/мин на 1 мг белка	
	сердце	скелетные мышцы
1. Контроль	$22,5 \pm 1,25$	$11,7 \pm 0,65$
2. Диабет	$15,3 \pm 0,85$	$8,6 \pm 0,48$
3. После лечения пирацином	$20,8 \pm 1,03$	$10,3 \pm 0,51$

Примечание. $p_{1-2, 2-3} = 0,01–0,001$.

ях, в том числе при сахарном диабете [2]. Активация процессов перекисного окисления липидов в сочетании с действием других патогенетических факторов играет важную роль в развитии сахарного диабета [5]. Избыточное образование свободных радикалов, накопление первичных (гидроперекисей липидов) и вторичных (малонового диальдегида — МДА и шиффовых оснований) продуктов липидной перекисидации ослабляет гидрофобные связи мембран, нарушая транспорт глюкозы, разобщая сопряжение инсулинрецепторного комплекса с переносчиком глюкозы в инсулинзависимых тканях, в том числе в скелетных мышцах.

Препараты цинка способствуют коррекции липидной перекисидации в мембранах скелетных мышц. Восстанавливая нарушенную структуру мембран, ионы цинка способствуют стимуляции сниженного при диабете поглощения глюкозы диафрагмой.

Наши исследования показывают, что под действием пирацина восстанавливается не только транспорт глюкозы, но и активность ПДК.

Результаты исследований по изучению активности ПДК представлены в табл. 2. Как видно из представленных данных, в норме активность ПДК в сердечных мышцах в 2 раза больше, чем в скелетных мышцах.

Нами установлено, что в условиях экспериментального сахарного диабета наблюдается снижение активности фермента в сердечных мышцах приблизительно на 35%, в скелетных мышцах на 13%.

Выявленное нами снижение активности фермента при аллоксановом диабете можно объяснить снижением уровня инсулина в условиях экспериментального сахарного диабета.

Кроме быстрого регуляторного влияния инсулина на ПДК, описаны эффекты долговременной недостаточной секреции эндогенного инсулина в процессе голодания или экспериментального сахарного диабета [6]. В этих случаях отмечено значительное уменьшение количества активной дефосфорилированной формы ПДК в сердце, скелетных мышцах и других тканях крыс. Голодание в течение 48 ч или вызванный аллоксаном диабет в митохондриях скелетных мышц крыс снижают долю дефосфорилированной формы комплекса.

Результаты наших исследований также показывают, что длительное введение пирацина крысам с экспериментальным сахарным диабетом приводит к некоторому восстановлению сниженной при диабете активности ПДК. Под действием координационного соединения цинка—пирацина происходит повышение активности ПДК в сердце на 30%, в скелетных мышцах на 20%.

Исследования, проведенные *in vitro*, также показывают, что под действием координационного соединения цинка происходит повышение активности ПДК.

Видимо, установленное нами стимулирующее влияние пирацина на активность ПДК объясняется гиполлипидемическим эффектом препарата. Возможно, что пирацин оказывает опосредованное действие на активность ПДК посредством влияния на уровень свободных жирных кислот.

Известно, что в тесной взаимосвязи с эффектами инсулина и других гормонов, влияющих на обмен липидов, находится чувствительность регуляторных механизмов ПДК к уровню жирных кислот в тканях. Жирные кислоты и их КоА-производные значительно уменьшают долю активной формы ПДК в митохондриях различных органов и тканей [10]. Это может быть сопряжено как с увеличением в митохондриях величины АТФ/АДФ, НАДН/НАД и ацетил-КоА/КоА при окислении жирных

кислот, так и с блокированием последними адениннуклеотид-трансферазы, что приводит к возрастанию энергетического заряда в матриксе митохондрий. Регуляторное значение опосредованной стимуляции фосфорилирования или торможения дефосфорилирования ПДК жирными кислотами несомненно, поскольку таким способом замедляется окислительное декарбоксилирование пирувата, который в условиях достаточного энергообеспечения клетки за счет окисления жирных кислот может направляться, например, на путь глюконеогенеза.

Кроме опосредованного, существует и прямое ингибирующее влияние свободных жирных кислот на ПДК [4]. Оно заключается в гидрофобном взаимодействии жирных кислот с липоцеллтрансферазой, приводящем к блокированию ее функционирования.

Оказывая гиполлипидемическое действие, пиранин, возможно, способствует устранению ингибирующего влияния жирных кислот на активность пируватдегидрогеназного комплекса.

Выводы

1. Установлено, что координационное соединение цинка пиранина оказывает стимулирующее влияние на процесс транспорта глюкозы в диафрагме крыс с экспериментальным сахарным диабетом.

2. Введение координационного соединения цинка пиранина животным с экспериментальным сахарным диабетом способст-

вует повышению активности ПДК в сердце и скелетных мышцах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методы биохимических исследований / Под ред. М. И. Прохоровой. — Л., 1982. — С. 192—194.
2. Griffin M. E., Marcucci M. J., Cline G. W. et al. // *Diabetes*. — 1999. — Vol. 48, N 6. — P. 1270—1274.
3. Grilly K. S., Kiss Z. // *Arch. Biochem.* — 2000. — Vol. 48, N 1. — P. 127—134.
4. Hall J. L., Stanley W. C., Lopashchuk G. D. et al. // *Am. J. Physiol.* — 1996. — Vol. 271, N 6, Pt 2. — P. H2320—H2329.
5. Ruiz C., Alegria A., Barbera R. et al. // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* — 1999. — Vol. 59, N 2. — P. 99—105.
6. Seymour A. M., Chatham J. C. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* — 1997. — Vol. 29, N 10. — P. 2771—2778.
7. Shisheva A., Shechter Y. // *Biochemistry*. — 1992. — Vol. 34. — P. 8059—8063.
8. Song M. K., Rosental M. J., Hong S. et al. // *Metabolism*. — 2001. — Vol. 50. — P. 53—59.
9. Von Dreele R. B., Stephens P. W., Smith G. D. et al. // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* — 2000. — Vol. 56, Pt 12. — P. 1549—1553.
10. Wu P., Inskeep K., Bowker Kinley M. M. et al. // *Diabetes*. — 1999. — Vol. 48, N 8. — P. 1593—1599.

Поступила 20.03.01

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2002

УДК 618.177-092:618.11-008.61]-085-092.9

А. Г. Резников, П. В. Сеницын, Л. В. Тарасенко, Л. И. Полякова

НЕЙРОЭНДОКРИННЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АНОВУЛЯЦИИ ГИПЕРАНДРОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Отдел эндокринологии репродукции и адаптации (зав. — член-корр. НАН и АМН Украины А. Г. Резников) Института эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко АМН Украины, Киев

На экспериментальной модели ановуляторного бесплодия гиперандрогенного происхождения (подкожная имплантация силикатных капсул с тестостероном половозрелым самкам крыс) изучены морфологические, гормональные и биохимические показатели, характеризующие состояние гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы. Найденные нарушения функционального метаболизма андрогенов в гипоталамусе, снижение чувствительности гипофиза к люлиберину, изменения структуры эстральных циклов, морфологические изменения в яичниках свидетельствуют о нейроэндокринных нарушениях регуляции овуляции. Использование флутамида в качестве средства экспериментальной антиандрогенной терапии привело к частичной нормализации гормональных, биохимических и морфологических характеристик, а также к восстановлению фертильности у самок с ановуляторным бесплодием.

An experimental model of anovulatory infertility of hyperandrogenic origin (subcutaneous implantation of silastic capsules with testosterone to mature female rats) was used to study morphological, hormonal, and biochemical indices that characterize the hypothalamic-pituitary-ovarian system. Disorders found in the functional metabolism of androgens in the hypothalamus, decreased pituitary response to hypothalamic hormone (HH), changes in the pattern of estrous cycles, ovarian morphological changes suggest that there are neuroendocrine disturbances ovulation regulation. The use of flutamide as a drug of experimental antiandrogenic therapy led to a partial normalization of hormonal, biochemical, and morphological characteristics and to recovery of fertility in female rats with anovulatory fertility.

Несмотря на неоспоримые успехи, достигнутые в последние годы в лечении ановуляторного бесплодия (АБ), связанные, в частности, с применением вспомогательных репродуктивных технологий, проблема поиска новых методов и средств лечения заболевания по-прежнему остается актуальной. В патогенезе АБ важную роль играет так называемый андрогенный фактор. Гиперандрогенные состояния у женщин, как правило, сопровождаются хронической ановуляцией. Удельный вес бесплодия гиперандрогенного генеза в структуре женской infertility составляет более 20% [3, 8].

Гиперандрогения в женском организме чаще всего является следствием повышенной секреции андрогенов яичниками (синдром поликистозных яичников) или надпочечными железами (андрогенитальный синдром). Применяемые в настоящее время методы лечения АБ предусматривают применение гормональных препаратов (кломифен, гонадотропины и др.) [4, 5]. Указанные индукторы овуляции, однако, оказываются малоэффективными в случаях значительной гиперандрогении, так как они

не способны угнетать чрезмерную продукцию андрогенов яичниками и(или) корой надпочечников. В последние годы в литературе появился ряд сообщений об использовании для лечения гиперандрогенизации у женщин, одним из проявлений которой является гирсутизм, антиандрогенных препаратов, таких как флутамид, ципротерона ацетат, кетоконазол, финастерид [10, 13, 14]. Отмечается положительный эффект некоторых из упомянутых препаратов в отношении уменьшения роста волос [6, 9], однако сведений о воздействии антиандрогенов на фертильность не приводится.

Цель настоящего исследования заключалась, во-первых, в создании экспериментальной модели АБ "гиперандрогенного" происхождения и изучении нейроэндокринных механизмов его развития и, во-вторых, в экспериментальной проверке возможности использования блокатора клеточных рецепторов андрогенов флутамида для восстановления овуляторных циклов и фертильной способности.