

Терапевтическая эффективность ронколейкина при экспериментальной гипергликемии

Э.В. Супрун*, С.В. Терещенко, Т.Д. Губченко

Национальный фармацевтический университет, Харьков, Украина

На модели аллоксанового диабета у крыс изучено влияние Тиоцетама (500 мг/кг) и рекомбинантного интерлейкина-2 (Ронколейкин, 0,01 мг/кг) на показатели системы глутатиона, энергетического метаболизма и окислительной модификации белков. Установлено, что развитие гипергликемии у экспериментальных животных сопровождалось изменением системы глутатиона (повышением уровня окисленного глутатиона и снижением уровня восстановленного глутатиона, а также активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы), энергетическим дефицитом и повышением уровней маркеров окислительной модификации белков – альдегидфенилгидразонов и кетонфенилгидразонов. Показано, что курсовое введение Тиоцетама и Ронколейкина способствовало нормализации активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, стабилизации уровней макроэргических фосфатов (АТФ, АДФ, АМФ) и показателей окислительной модификации белков; максимальное влияние на изученные параметры отмечено у Ронколейкина.

Ключевые слова: интерлейкин-2, Ронколейкин, тиоцетам, экспериментальный сахарный диабет, глутатион.

Введение

В последние десятилетия глобальной медико-социальной проблемой является сахарный диабет (СД), который входит в число 7 главных причин смертности населения в большинстве стран мира и занимает третье место среди непосредственных причин смерти после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний [1]. Специалисты отмечают также неуклонный рост распространенности СД – в Украине за последние 10 лет количество больных сахарным диабетом увеличилось более чем в 1,5 раза и составляет около 1 млн. человек, поэтому решение проблем терапии СД приобретает уровень государственной значимости [2]. В настоящее время во всем мире накоплены доказательства того, что эффективный контроль диабета может свести к минимуму развитие многих связанных с ним осложнений, в том числе неврологических, которые и определяют продолжительность жизни больного и его работоспособность (энцефалопатии, дистальные невропатии, преходящие нарушения мозгового кровообращения, инсульт). Относительный риск развития инсульта у лиц с СД 2 типа в 1,8–6 раз выше по сравнению с лицами без СД [3].

Высокая частота осложнений СД

обусловлена нарушениями тканевого метаболизма с масштабным повреждением микрокапиллярного русла органов, что приводит к формированию мультиорганной патологии. При этом на фоне типичных нарушений микроциркуляции происходит постишемическое повреждение ткани мозга – развивается энергетический дефицит, формируется глутамат-кальциевый каскад с чрезмерным внутриклеточным накоплением ионов Ca^{2+} и явлениями эксайтотоксичности, а также лактат-ацидоз и отек мозга, развитие оксидативного стресса и гибель клеток путем некроза или апоптоза [4]. Оксидативный стресс характеризуется интенсификацией процессов свободнорадикального окисления на фоне снижения активности антиоксидантной системы (в том числе ферментативной глутатионпероксидазной/глутатионредуктазной (ГП/ГПР) системы), при этом активные метаболиты кислорода «атакуют» белки, липиды и нуклеиновые кислоты клеток и вызывают их окислительную модификацию. Поэтому главной задачей эффективной терапии СД является блокирование взаимообусловленных механизмов прогрессирования СД – сосудистых, метаболических и феномена оксидативного стресса, в связи с чем все большее внимание уделяется препаратам с антиоксидантным действием.

*Corresponding author: elinasuprun202@gmail.com

К веществам, обеспечивающим в очаге ишемии/гипоксии как повреждающее действие, так и систему жизнеспособности клеток, относятся цитокины – трансмиттеры межклеточного взаимодействия в норме и при патологии, которые формируют сеть коммуникативных сигналов между клетками иммунной системы и клетками других органов и тканей. По современным представлениям, характер иммунного ответа и особенности развития патофизиологических изменений при ишемически/гипоксических тканевых расстройствах зависит от преимущественной активации субпопуляций Т-лимфоцитов, синтеза ими цитокинов различных типов и формирования «цитокинового каскада», а именно соотношения провоспалительных и противовоспалительных цитокинов [5]. Следовательно, эффективным перспективным звеном в комплексной терапии пост-ишемических неврологических осложнений при СД может стать применение цитокиновых препаратов.

Первым из провоспалительных цитокинов в зоне ишемии продуцируется интерлейкин-1 (IL-1), который также обладает свойством стимулировать синтез секретируемых Т-хелперами ростовых факторов – IL-2 и IL-4. IL-2 участвует в формировании быстрого иммунного ответа организма – индуцирует пролиферацию В-лимфоцитов, активирует цитотоксические Т-лимфоциты, стимулирует естественные киллеры, генерирует лимфокин-активированные киллеры, поэтому в клинической практике рекомбинантный IL-2 (Ронколейкин) используется для коррекции вторичной иммунной недостаточности в комплексной терапии тяжелых гнойно-воспалительных заболеваний разной этиологии и онкологических процессов [6].

Цель исследования – изучение динамики показателей глутатионовой системы, энергетического метаболизма и ОМБ в тканях головного мозга крыс с экспериментальным СД при применении церебропротектора метаболического действия Тиоцетама и цитокинового препарата – рекомбинантного IL-2 (Ронколейкина).

Материалы и методы

Исследования проводились на 40 белых крысах линии Вистар массой 250-300г, содержащихся в стандартных условиях вивария и распределенных на 4 группы по

десять животных в каждой. Первая группа – интактные животные, вторая – животные с экспериментальным сахарным диабетом (СД, контроль патологии), третья – животные с СД, которым вводили тиоцетам в дозе 500 мг/кг внутримышечно 1 раз в сутки (группа СД+Тиоцетам); четвертая – животные с СД, которым вводили Ронколейкин в дозе 0,01 мг/кг внутримышечно 1 раз в сутки (группа СД+Ронколейкин). Животным первой и второй групп на протяжении исследования в соответствующем объеме внутримышечно вводили стерильный физиологический раствор. Экспериментальный диабет моделировали с помощью однократного подкожного введения водного раствора аллоксана моногидрата (Sigma, США) в дозе 150 мг/кг в виде 5% раствора в ацетатном буфере, pH 4,5. Введение данного вещества осуществляли после предварительной 24-часовой пищевой депривации при сохраненном доступе к воде. С целью формирования полного и стабильного диабета, животных содержали на стандартной диете. Уровень глюкозы крови определялся на 3 сутки после введения аллоксана с помощью глюкометра Optium Omega (Abbot Diabetes Care Inc., США). Для последующих исследований использованы только животные с повышенным уровнем глюкозы (>11 ммоль/л). Материалом для биохимических исследований явились фрагменты ткани головного мозга, находящиеся в области среднемозговой артерии и гомогенизированные в жидком азоте. Цитозольную фракцию выделяли методом дифференциального центрифугирования (15000 g) при температуре +4 °C в 0,15 М фосфатном буфере, pH 7,8. Безбелковый экстракт получали добавлением точного количества гомогената ткани мозга в хлорную кислоту (0,6 М) с последующей нейтрализацией 5,0 М раствором карбоната калия. Для изучения активности системы глутатиона в гомогенате головного мозга крыс определяли уровни восстановленного и окисленного глутатиона флюориметрическим методом [7], активность глутатионпероксидазы (ГП) и глутатионредуктазы (ГР) – спектрофотометрическим методом [8]. Также в гомогенате мозга биохимическими методами определяли содержание продуктов окислительной модификации белка по уровню альдегидных (АФГ) и карбоксильных (КФГ) продуктов [9]. Для оценки процессов углеводно-энергетического обмена и окисления в цикле

Креба в гомогенате мозга определяли уровень адениловых нуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ), а также пирувата, лактата и малата [10]. Статистическую обработку данных производили с помощью пакета программы «Statistica 6.0», сравнительный анализ в группах проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA. Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных нами исследований при формировании аллоксанового диабета было установлено нарушение системы

глутатиона – энзимов ГП и ГР, окисленной и восстановленной форм глутатиона (табл. 1).

У животных с СД отмечена выраженная диспропорция – повышение относительно контрольных показателей уровней окисленного глутатиона в 2,7 раза ($p < 0,001$), что подтверждает формирование выраженных нарушений внутриклеточного пула глутатиона.

В гомогенате мозга экспериментальных животных развитие гипергликемии сопровождалось выраженным снижением активности энзимов тиол-дисульфидной системы – ГП на 76% ($p < 0,001$) и ГПР на 79% ($p < 0,001$) по сравнению с группой интактных животных (рис.).

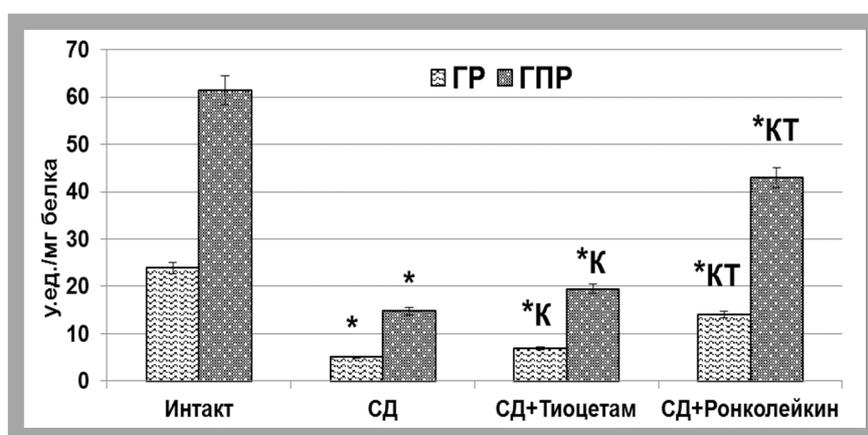


Рис. Активность глутатионпероксидазы (ГП) и глутатионредуктазы (ГПР) в тканях головного мозга крыс с СД. Интакт – интактные крысы; СД – сахарный диабет; СД+Тиоцетам – сахарный диабет + Тиоцетам; СД+Ронколейкин – сахарный диабет + Ронколейкин. Статистически достоверные отличия ($p < 0,05$) относительно интактных крыс отмечены знаками «*», относительно крыс с сахарным диабетом – знаками «К», относительно крыс группы СД+Тиоцетам – знаками «КТ».

Таблица 1 Суммарные показатели окисленной (GSSG) и восстановленной (GSH) форм глутатиона и содержание альдегидных (АФГ) и карбоксильных (КФГ) продуктов в тканях головного мозга крыс с аллоксановым диабетом ($M \pm m$) ($n=10$)

Группа животных	GSSG, мкМ /г/белка	GSH, мкМ /г/белка	АФГ, у.е./г/белка	КФГ, у.е./г/белка
Интактные	0,27±0,03	4,49±0,38	1,49±0,16	1,01±0,09
СД	0,75±0,06*	0,56±0,06*	3,44±0,39*	2,26±0,15*
СД+Тиоцетам	0,46±0,05* ^К	0,71±0,06* ^К	2,48±0,22* ^К	1,44±0,15* ^К
СД+Ронколейкин	0,38±0,03* ^{КТ}	2,45±0,24* ^{КТ}	1,84±0,19* ^{КТ}	1,47±0,06* ^К

Здесь и в табл. 2, 3 – СД – сахарный диабет; СД+Тиоцетам – сахарный диабет + Тиоцетам; СД+Ронколейкин – сахарный диабет + Ронколейкин. Статистически достоверные отличия ($p < 0,05$) относительно интактных крыс отмечены знаками «*», относительно крыс с сахарным диабетом – знаками «К», относительно крыс группы СД+Тиоцетам – знаками «КТ».

Поражение ткани головного мозга крыс с гипергликемией сопровождалось также увеличением в гомогенате мозга в 2,2 раза альдегидфенилгидразонов (АФГ) и в 2,3 раза кетонфенилгидразонов (КФГ) – маркеров

ОМБ, которые образуются в условиях оксидативного и нитрозирующего стресса (табл. 1).

Развитие аллоксанового диабета и формирование ангиопатий с пост-

гипоксическими изменениями тканей привело к дисбалансу пула макроэргических фосфатов в ткани мозга контрольных животных. Отмечено значительное снижение уровней АТФ и АДФ – соответственно на 70% и 71% (табл.2). Уровень АМФ в группе СД достоверно отличался от уровней интактных животных – был выше на 89%, что адекватно снижению в эти периоды АТФ и, возможно, отражает его усиленный распад на фоне ишемического повреждения. Следует отметить, что АМФ является активным прооксидантом, поэтому рост его количества дополнительно усиливает агрессивные последствия оксидантного стресса в ткани головного мозга. Изучение показателей

углеводного обмена (табл.3) подтверждает развитие в условиях экспериментального СД декомпенсированного ацидоза в ткани мозга – повышение лактата в 2,8 раза на фоне снижения содержания малата и пирувата соответственно на 66% и 62%.

В условиях экспериментальной терапии были получены следующие результаты влияния Тиоцетама и Ронколейкина на изученные показатели (рис.1, табл.1-3). На фоне введения Тиоцетама у экспериментальных животных отмечено снижение образования окисленного глутатиона на 39% относительно контрольных показателей на фоне повышения активности ГР и ГПР на 32-37%, соответственно.

Таблица 2 Показатели энергетического метаболизма (АТФ, АДФ, АМФ) в тканях головного мозга крыс с аллоксановым диабетом ($M \pm m$) (n=10)

Группа животных	АТФ, мкмоль/г ткани	АДФ, мкмоль/г ткани	АМФ, мкмоль/г ткани
Интактные	3,62±0,17	0,43±0,01	0,10±0,01
СД	1,09±0,12*	0,13±0,01*	0,19±0,02*
СД+Тиоцетам	1,77±0,17* ^К	0,16±0,02* ^К	0,13±0,01* ^К
СД+ Ронколейкин	2,59±0,18* ^{КТ}	0,32±0,03* ^{КТ}	0,11±0,01 ^К

Таблица 3 Показатели углеводного обмена (лактат, малат, пируват) в тканях головного мозга крыс с аллоксановым диабетом ($M \pm m$) (n=10)

Группа животных	Лактат, мкмоль/г ткани	Малат, мкмоль/г ткани	Пируват, мкмоль/г ткани
Интактные	2,42±0,09	0,75±0,08	0,19±0,03
СД	6,86±1,02*	0,26±0,03*	0,07±0,01*
СД+Тиоцетам	6,19±0,42*	0,43±0,05* ^{КП}	0,09±0,01*
СД+ Ронколейкин	3,90±0,67* ^{КТ}	0,49±0,06* ^К	0,13±0,01* ^{КТ}

Применение Тиоцетама привело также к достоверному относительно группы СД снижению маркеров ОМБ, особенно КФГ (на 36%). В группе Тиоцетама относительно контрольной группы отмечена стабилизация энергетических показателей тканей мозга экспериментальных животных – снизились показатели АМФ на 30%, повысились уровни АТФ и АДФ соответственно на 62% на 30%, однако сохранились достоверные отличия этих показателей от интактных. Выраженность ацидоза в тканях мозга крыс с СД на фоне применения Тиоцетама уменьшилась – отмечено достоверное повышение уровней малата на 67% и снижение содержания лактата.

Введение Ронколейкина животным с СД оказало наиболее выраженное влияние на

состояние системы глутатиона – показатель окисленного глутатиона снизился в 2 раза по сравнению с контролем. При этом активно повышался уровень восстановленного глутатиона, активность энзимов ГР/ГПР системы возрастала почти в 4 раза ($p < 0,001$), что достоверно превышало эффект Тиоцетама. Курсовое введение Ронколейкина способствовало снижению маркеров окислительной модификации белков в ткани головного мозга соответственно на 47% та 35% ($p < 0,01$). Важно отметить, что влияние Ронколейкина на параметры оксидативного стресса было более выраженным на уровни раннего маркера ОМБ (АФГ), в то время как Тиоцетам был более активным относительно позднего маркера ОМБ (КФГ). Применение Ронколейкина при повреждении ткани мозга в

условиях гипергликемии (аллоксанового сахарного диабета) привело к повышению в 2,5 раза относительно группы СД уровней АТФ и АДФ на фоне выраженного снижения АМФ (на 53%), к повышению более чем в 2 раза уровней малата и пирувата. Содержание лактата при этом снижается на 58% от уровня животных группы СД.

Таким образом, при поражении ткани мозга на модели аллоксан-индуцированного диабета сдвиг равновесия системы глутатиона происходит за счет снижения активности ГР и ГПР и уровней восстановленного глутатиона на фоне значительного роста его окисленных форм, что сопровождается дисбалансом энергетического метаболизма и выраженными процессами окислительной модификации белков. Подобные патобиохимические изменения приводят к существенным функциональным изменениям в клетках и часто являются необратимыми.

Основной причиной метаболических изменений при СД является абсолютный или относительный недостаток инсулина, который в физиологических условиях обеспечивает метаболические внутри- и внеклеточные процессы. При СД дефицит инсулина приводит к нарушениям обмена углеводов, жиров и белков, провоцирует гипергликемию, инсулинорезистентность и энергодефицит, активацию синтеза активных форм кислорода (АФК), свободных радикалов и продуктов перекисного окисления липидов, т.е. формирует патофизиологическую картину оксидативного стресса. Гиперпродукция АФК (супероксид-радикала, гидроксил-радикала, NO-радикала, а впоследствии и пероксинитрита (ONOO⁻)) играет ключевую роль в развитии оксидативного и нитрозирующего стресса, вызывает повреждение макромолекул. Повышение уровней АФК стимулирует синтез транскрипционного фактора, индуцируемого гипоксией (HIF), активацию HIF-1-зависимых генов, синтез провоспалительных цитокинов и формирует порочный круг вторичных повреждений [11].

При ишемии первичными источниками АФК являются митохондрии. Митохондрии нейронов является важным источником оксида азота (NO), который образуется путем окисления терминальной гуанидиновой группы L-аргинина при участии NO-синтазы (NOS). При гипоксическом поражении мозга на фоне перевозбужденных глутаматных NMDA-рецепторов активация Ca²⁺-зависимой

кальмодулинкиназы активирует нейрональную NOS (nNOS), и в течение нескольких секунд синтез оксида азота резко повышается [12]. Установлено наличие локализованной во внутренней мембране конститутивной формы митохондриальной NO-синтазы (mNOS), которая способна продуцировать супероксид уже при субоптимальных концентрациях L-аргинина. При ишемии mNOS активируется в ответ на развитие глутаматной эксайтотоксичности, поглощения митохондриями кальция и продукцию провоспалительных цитокинов. Образуется пероксинитрит, который способствует открытию неселективной гигантской поры митохондрий (PT-поры), нитрозилирует в митохондриях цитохром C, что приводит к изменению его функций – неспособности поддерживать перенос электронов в дыхательной цепи и восстанавливаться аскорбатом [13].

Сформировавшаяся в результате дефицита кислорода дисфункция митохондриального аппарата выражается в последовательных фазных изменениях активности митохондриальных ферментных комплексов. Митохондриальная дисфункция является базисным механизмом энергетических нарушений и коррелирует с фазными изменениями в содержании адениловых нуклеотидов (АТФ, АДФ и АМФ), что приводит к формированию постгипоксического метаболического дисбаланса и опережает изменения других функционально-метаболических показателей жизнедеятельности клетки [14]. В период стадии энергетических нарушений происходит увеличение проницаемости мембран и активация свободнорадикальных процессов, в том числе активация процессов ПОЛ и ОМБ, а также гиперпродукция оксида азота и нарушения углеводного обмена. Снижение при тканевой гипоксии образования АТФ в цикле Кребса приводит к компенсаторной активации альтернативных путей образования энергоемких фосфатов, в том числе анаэробного гликолиза. При этом усиливается образование лактата и ионов водорода, что приводит к развитию метаболического ацидоза и играет важную роль в дальнейшем повреждении ткани головного мозга, т.е. в переходе от избирательного некроза нейронов к формированию инфаркта мозга. Внутриклеточный ацидоз угнетает метаболические реакции, ионный транспорт, что приводит к дальнейшему накоплению ионов Ca²⁺ и дополнительной активации Ca²⁺-зависимых

патогенетических механизмов постишемической агрессии – углублению оксидативного стресса, синтезу чрезмерных количеств NO и активации внутриклеточных ферментов. Таким образом, ацидоз оказывает непосредственное цитотоксическое действие. Кроме того, ацидоз изменяет свойства мембран, вызывает их «рыхлость», что повышает проницаемость эндотелия и нейронов. Это приводит к повышению внутриклеточного осмотического давления, набуханию клеток и сдавлению ими окружающих тканей и микроциркуляторного русла, что также ухудшает состояние нейронов в зоне поражения [12,13].

В условиях гипергликемии накопление продуктов перекисного окисления приводит к взаимодействию глюкозы с аминокеттогруппами белков, усилению их гликозилирования и окисления, что приводит к снижению активности и даже полной инактивации ферментов антиоксидантной защиты. Ключевую роль в толерантности нейронов головного мозга к ишемии играет одной из ведущих антиоксидантных систем в организме – система глутатиона. Глутатион непосредственно либо посредством ферментативных реакций эффективно защищает клетки от свободных радикалов и других реактивных разновидностей кислорода, например, гидроксильного радикала, липид-пероксильного радикала, пероксинитрита и перекиси водорода. Также глутатион принимает участие в функционировании ГР/ГПР системы, играющей важную роль в поддержании внутриклеточного окислительно-восстановительного гомеостаза [15]. Конкурендно связываясь с оксидом азота, глутатион образует комплекс в виде S-нитрозоглутатиона, формирующий депо эндогенного NO, что объясняет как взаимную регуляцию пула эндогенного оксида азота и внутриклеточного глутатиона, так и специфическое цитопротекторное действие последнего – предотвращение связывания молекулы NO с супероксидом препятствует образованию пероксинитрита и блокирует его возможные нейротоксические эффекты. В то же время доказано, что дефицит внутриклеточной системы глутатиона способствует окислительному стрессу, который играет ключевую роль при многих заболеваниях, включая инсульт, инфаркт миокарда, сахарный диабет и др. [16].

Снижение уровня восстановленного глутатиона в тканях мозга, обнаруженное нами

у крыс с аллоксановым диабетом, может быть следствием нарушения его синтеза вследствие повреждения тканевого дыхания, обусловленного как гипоксией, так и сахарным диабетом. Это в свою очередь приводит к уменьшению уровня АТФ, необходимой для синтеза глутатиона. Кроме того, недостаток уровня восстановленного глутатиона в условиях ишемии не способен блокировать взаимодействие NO с супероксид-анионом и последующим образованием пероксинитрита.

Прерывание патогенетического постгипоксического каскада на максимально ранних этапах, в том числе на этапе формирования дисфункции антиоксидантной системы глутатиона позволит добиться максимального протективного эффекта при лечении СД. Стабилизация функционирования антиоксидантной системы глутатиона и ГР/ГПР ферментов позволит защитить ткани головного мозга от проявлений оксидативного и нитрозирующего стресса, а именно предупредить деполяризацию и дестабилизацию внутренней мембраны митохондрий с последующим формированием митохондриальной дисфункции, энергетического дисбаланса и иных пост-ишемических последствий.

В предыдущих исследованиях нами установлено, что при введении Ронколейкина крысам с аллоксан-индуцированным СД отмечено восстановление (рост) мембранного потенциала и стабилизация функционального состояния митохондрий. Следствием этого является прямое энерготропное действие Ронколейкина – нормализация состояния внутренней мембраны митохондрий ведет к восстановлению активности дыхательной цепи митохондрий, синтеза АТФ, АДФ и увеличению их уровней с соответствующим снижением уровней АМФ. Рост мембранного потенциала под действием Ронколейкина стабилизирует активность митохондриальных ферментов, важных для трансмембранных энергетических реакций, что также ведет к увеличению уровней АТФ. Восстановление функционального состояния митохондрий под действием Ронколейкина предупреждает дестабилизацию внутренней мембраны митохондрий с формированием неспецифической РТ-поры и разрывами внешней мембраны, а также обеспечивает эффективность процессов митохондриального окислительного фосфорилирования и блокирует образование реактивных АФК и развитие агрессивных цитотоксических

процессов ПОЛ и ОМБ.

Введение Ронколейкина способствовало нормализации углеводного обмена в клетках головного мозга крыс – повышению уровней пирувата и малата на фоне снижения содержания лактата, что предупреждает развитие лактат-ацидоза в условиях экспериментальной гипергликемии. Активация под действием Ронколейкина синтеза АТФ и рост его содержания в ткани мозга предотвращает формирование его дефицита, снижает компенсаторную активацию анаэробного гликолиза, ингибирует усиленное образование лактата и ионов H^+ и блокирует возможные проявления лактат-ацидоза в клетках головного мозга крыс с СД, в том числе активацию нейронального некроза.

Объяснить влияние Ронколейкина на формирование нейродегенеративных нарушений тканей головного мозга при гипергликемии возможно реализацией внутриклеточных сигнальных путей $IL-2$, который через MAP-киназный каскад ведет к активации других транскрипционных факторов, в частности AP-1, индуцирует c-jun и c-fos и AP-1-ассоциированные протеины, стимулирует синтез молекул, регулирующих воспалительную реакцию и антиапоптотическую активность. Это ведет к формированию раннего клеточного иммунного ответа. В частности, путем формирования петли негативной обратной связи с активностью T-регулирующих лимфоцитов (Treg) и Th-лимфоцитов на периферии $IL-2$ стабилизирует гиперпродукцию лимфоцитов, их Th- и Treg-зависимую активацию, снижает активность цитотоксических реакций аутоиммунной агрессии, проявления локального воспаления и ведет к стабилизации состояния эндотелиальных клеток церебральных сосудов, блокирует формирование отека мозга и нормализует функциональное состояние клеток мозга. По нашему мнению, $IL-2$, транскрипция генов которого зависит от уровней c-Fos, блокирует индукцию в T-лимфоцитах c-Fos-белка по принципу обратной связи и приводит к снижению его

уровней, что стабилизирует процессы апоптоза.

Таким образом, терапевтический эффект Ронколейкина при экспериментальной гипергликемии состоит из стабилизации энергетического обмена, функционального состояния митохондрий и клеточных мембран, снижении проявлений оксидативного и нитрозилирующего стрессов, повышении активности тиол-дисульфидных антиоксидантных ферментов, что, вероятно, стабилизирует процессы апоптоза и ведет к активации синтеза РНК на фоне стабилизации состояния клеток головного мозга.

Выводы

1. Поражение ткани головного мозга крыс на модели аллоксан-индуцированного диабета сопровождалось нарушением равновесия системы глутатиона (повышением уровня окисленного глутатиона и снижением уровня восстановленного глутатиона, а также активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы), пула макроэргических фосфатов (снижение уровней АТФ и АДФ на фоне выраженного повышения показателей АМФ) и увеличением в гомогенате мозга маркеров окислительной модификации белков – АФГ и КФГ.

2. Курсовое применение Тиоцетама и Ронколейкина способствовало стабилизации энергетического метаболизма и активности реакций свободно-радикального окисления в тканях головного мозга крыс с СД (снижению уровня окисленного глутатиона, АФГ и КФГ, повышению уровня восстановленного глутатиона, АТФ, а также активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы).

3. Терапевтическая эффективность Ронколейкина при экспериментальной гипергликемии (стабилизация глутатионовой системы и энергетического баланса, предупреждение оксидативного и нитрозилирующего стресса) превышает таковую у Тиоцетама.

Литература

1. Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, Zinman B; American Diabetes Association; European Association for Study of Diabetes. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*. 2009 Jan;32(1):193-203. doi: 10.2337/dc08-9025.

2. Дедов ИИ. Сахарный диабет: развитие технологий в диагностике, лечении и профилактике (пленарная лекция). Сахарный диабет. 2010; 48(3):6-13.
3. Ахметов АС. Сахарный диабет. Проблемы и решения. Руководство. М., 2011.
4. Манухина ЕБ, Дауни ХФ, Маллет РТ, Малышев ИЮ. Защищающие и повреждающие эффекты периодической гипоксии: роль оксида азота. Вестник РАМН. 2007; (2):27-33.
5. Кетлинский СА, Симбирцев АС. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008.
6. Fujinami RS. Reviews in neuroimmunology. J Neurovirol. 2014;20(2):105-6. doi: 10.1007/s13365-013-0230-6.
7. Кулинский ВИ, Колесниченко ЛС, Шпрах ВВ, Верлан НВ, Бардымов ВВ, Губина ЛП, Пенсионера ГА, Сергеева МП, Станевич ЛМ, Филиппова ГТ. Изучение глутатиона и ферментов его метаболизма у больных старших возрастных групп с хронической церебральной ишемией. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2005; 1(39):63-5.
8. Асатиани ВС. Ферментные методы анализа. М.: Наука, 1969.
9. Дубкіна ОЮ. Окислювальний стрес і окислювальна модифікація білків. Мед. хімія. 2001; 3(2):43-5.
10. Прохорова МИ. Современные методы в биохимии (углеводный и энергетический обмен). Л.: Изд-во ЛГУ, 1986.
11. Губский ЮИ, Беленичев ИФ, Левицкий ЕЛ, Коваленко СИ, Павлов СВ, Ганчева ОВ, Марченко АН. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях (обзор литературы). Совр. пробл. токсикол. 2005; 3:20-6.
12. Беленичев ИФ, Черний ВИ, Колесник ЮМ, Павлов СВ, Андропова ИА, Абрамов АВ, Островая ТВ, Бухтиярова НВ, Кучеренко ЛИ. Рациональная нейропротекция. Донецк: Изд. Дом Заславский, 2009.
13. Скворцова ВИ. Механизмы повреждающего действия церебральной ишемии и новые терапевтические стратегии. Инсульт. 2003; 9:20-2.
14. Лукьянова ЛД, Дудченко АМ. Регуляторная роль митохондриальной дисфункции при гипоксии и ее взаимодействие с транскрипционной активностью. Вестник РАМН. 2007; 2:3-13.
15. Колесник ЮМ, Чекман ИС, Беленичев ИФ, Горбачева СВ, Горчакова НА, Бухтиярова НВ. Тиол-дисульфидное равновесие – определяющий фактор резистентности нейронов к нитрозирующему стрессу в условиях ишемии мозга (обзор литературы). Журнал НАМН України. 2013; 19(1):3-11.
16. Коржов ВИ. Роль системы глутатиона в процессах детоксикации и антиоксидантной защиты. Журн.НАМН України. 2007; 13(1):3-19.

Терапевтична ефективність Ронколейкіну при експериментальній гіперглікемії

Супрун Е.В., Терещенко С.В., Губченко Т.Д.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

На моделі алоксанового діабету у щурів вивчено вплив тіоцетаму і рекомбінантного інтерлейкіну-2 (Ронколейкін) (0,01 мг/кг) на показники системи глутатіону, енергетичного метаболізму та окиснювальної модифікації білків (ОМБ). Встановлено, що розвиток гіперглікемії у експериментальних тварин супроводжувався дестабілізацією системи глутатіону (підвищенням рівнів окиснених форм глутатіону на тлі різкого зниження їх відновлених форм та активності глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази), енергетичним дефіцитом і підвищенням рівнів маркерів ОМБ – АФГ і КФГ. Виявлено, що курсове введення тіоцетаму і Ронколейкіну сприяло нормалізації активності глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази, стабілізації рівнів макроергічних фосфатів (АТФ, АДФ, АМФ) та показників ОМБ; максимальна активність відзначена у Ронколейкіну.

Ключові слова: інтерлейкін-2, Ронколейкін, тіоцетам, експериментальний цукровий діабет, глутатіон.

Therapeutic efficacy of Roncoleukin in experimental hyperglycemia

Suprun E.V., Tereshenko S.V., Gubchenko T.D.

National Pharmaceutical University, Kharkiv, Ukraine

Aims. Diabetes mellitus (DM) is one of 7 main mortality causes in most countries of the world and is third among immediate causes of death after cardiovascular and oncological diseases. Nowadays, a body of evidence is amassed in the whole world, as to the fact that effective DM control determines life expectancy of the patients and their performance capability, as well as may keep development of the related complications to a minimum. It is proved, that the most important biological role for antioxidant system is in reduction oxidative reactions, in which thiol groups are easily oxidized, generally to form disulfide groupings, and again regenerated under their reductive splitting. Based on such transformations, a reversible thiol-disulfide system (TDS) is formed. TDS intermediates exhibit transport properties to nitrogen oxide (NO), thus increasing its bioavailability. Besides, many thiols – glutathione, cysteine, methionine – are able to considerably limit cytotoxicity of NO and its derivatives, thus multiplying neuron chances to survive in case of ischemia. Agents, providing both for damaging effect and cell viability system in the ischemia/hypoxia area, include cytokines – intercellular communication transmitters in health and disease, which

establish communication signal network between cells of the immune system and cells of other organs and tissues. According to present day ideas, nature of immune response and peculiarities of development of the pathophysiological changes in ischemic/hypoxic tissue disorders depends on preemptive activation of the T-lymphocyte subpopulations, their synthesis of cytokines of various types and formation of "cytokine cascade". Primary goal of the effective DM therapy is to block interdependent mechanisms of DM progression – vascular, metabolic events and oxidant stress phenomenon, for which reason increasingly greater attention is paid to medications with antioxidant effect. Agents, providing both for damaging effect and cell viability system in the ischemia/hypoxia area, include cytokines. Therefore, application of cytokine preparations may become effective perspective link in the complex therapy of post-ischemic complications in DM. The aim of the study was to investigate the influence of thiocetam (500 mg/kg) and recombinant interleukin-2 (Roncoleukin) (0.01 mg/kg) on the performance of the glutathione system, energy metabolism and protein oxidative modification products in experimental diabetes.

Methods. Experiments were performed in 40 Wistar rats. Experimental diabetes was simulated by means of single subcutaneous administration of alloxan monohydrate water solution (Sigma, USA) – 150 mg/kg as 5% acetate buffer solution with pH 4.5. Brain tissue fragments from mesencephalic artery region, homogenized in liquid nitrogen, were used as materials for biochemical researches. This solution was administered after preliminary 24-hour food deprivation with allowed access to water. In order to generate full and stable diabetes, the animals were put on a standard diet for 11 days. Blood glucose level was determined on the 11th day after alloxan administration using glucose meter Optium Omega (Abbot Diabetes Care Inc., USA). For further researches, only animals with high glucose level (> 11 mmol/l) were used. Cytosolic fraction was separated by differential centrifugation (15,000 g) at the temperature of +4°C on phosphate buffer 0.15 M with pH 7.8. Protein-free extract was obtained by adding exact amount of brain tissue homogenate into perchloric acid (0.6 M) followed by neutralization by 5.0 M of potassium carbonate. To study thiol-sulfide system activity in the rat brain tissue homogenate, levels of reduced and oxidized thiols and glutathione, and activity of glutathione peroxidase (GP) and glutathione reductase (GR) were determined. Content of total SH-groups were measured by spectrophotometry [8]. Concentration of reduced and oxidized glutathione was measured by fluorometry [9]. Activity of TDS enzymes – GP and GR – was measured by spectrophotometry [10]. Content of methionine and cysteine in the homogenate was measured by chromatography [8]. Also, using biochemical methods, content of protein oxidative modification products was measured in the brain homogenate by levels of aldehyde (AphH) and carboxyle (KphH) products [11]. Statistical data processing was carried out by means of Statistica 6.0 software package; comparative group analysis was performed by means of one-way analysis of variance ANOVA using Newman–Keuls test for multiple comparisons. Differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results. It was found that the development of hyperglycemia in experimental animals was accompanied by destabilization of the glutathione system (increased levels of oxidized glutathione and a sharp decrease in its activity and reduced forms of glutathione peroxidase and glutathione reductase), energy shortages and rising levels of markers protein oxidative modification products – aldehyde (AphH) and carboxyle (KphH) products. The course administration of thiocetam and Roncoleukin contributed to the normalization of activity of glutathione peroxidase and glutathione reductase, to stabilization of the levels of energy phosphates (ATP, ADP, AMP) and protein oxidative modification products figures; the maximum activity was observed for Roncoleukin.

Conclusion. The therapeutic efficacy of Roncoleukin in experimental hyperglycemia is manifested in the stabilization of the glutathione system and energy balance, the prevention of oxidative and nitrosylating stress, and exceeds that of Thiocetam.

Keywords: interleukin-2, Roncoleukin, Thiocetam, experimental alloxan diabetes, glutathione.

References

1. Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, Zinman B; American Diabetes Association; European Association for Study of Diabetes. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*. 2009 Jan;32(1):193-203. doi: 10.2337/dc08-9025.
2. Dedov II. Diabetes mellitus: the development of technology in the diagnosis, treatment and prevention (plenary lecture). *Diabetes*. 2010; 48(3):6-13.
3. Akhmetov AS. *Diabetes. Problems and solutions: Guidelines*. Moscow: GEOTAR–Media, 2011.
4. Manukhina EB, Downey HF, Mallet RT, Malyshev IYu. Protecting and damaging effects of periodic hypoxia: the role of nitric oxide. *Vestnik Russ Acad Med Sci*. 2007; (2):27-33.
5. Ketlinsky SA, Simbirtsev AS. *Cytokines*. St. Petersburg: Folio, 2008.
6. Fujinami RS. Reviews in neuroimmunology. *J Neurovirol*. 2014;20(2):105-6. doi: 10.1007/s13365-013-0230-6.
7. Kulinskiy VI, Kolesnichenko LS, Shprakh VV, Verlan NV, Bardymov VV, Gubina LP, Pensionerova GA, Sergeieva MP, Stanevich LM, Filippova GT. Study of glutathione and its metabolic enzymes in elderly patients with chronic cerebral ischemia. *Bulletin VSNC SO RAMS*. 2005; 1(39):63-5.
8. Asatiani VS. *Enzymatic methods of analysis*. Moscow: Nauka, 1969.
9. Dubkina OYu. Oxidative stress and oxidative modification of the proteins. *Med. Khimia*. 2001; 3(2):43-5.

10. Prokhorova MI. Modern methods in biochemistry (carbohydrate and energy metabolism). Leningrad: Publishing House of Leningrad State University, 1986.
11. Gubskiy YuI., Belenichev IF, Levitskiy YeL, Kovalenko SI, Pavlov SV, Gancheva OV, Marchenko AN. Toxic effects of oxidative modification of proteins in various pathological conditions (review). *Sovrem Probl Toxicologii*. 2005; 3:20-6.
12. Belenichev IF, Chernii VI, Kolesnik YuM, Pavlov SV, Andronova IA, Abramov AV, Ostrovaya TV, Bukhtiyarova NV, Kucherenko LI. Rational neuroprotection. Donetsk: Publ House Zaslavskii, 2009.
13. Skvortsova VI. Mechanisms of the damaging effect of cerebral ischemia and new therapeutic strategies. *Insult*. 2003; 9:20-2.
14. Lukyanova LD, Dudchenko AM. The regulatory role of mitochondrial dysfunction in hypoxia and its interaction with transcriptional activity. *Vestnik Russ Acad Med Sci*. 2007; 2:3-13.
15. Колесник ЮМ, Чекман ИС, Беленичев ИФ, Горбачева СВ, Горчакова НА, Бухтиярова НВ. Тиол-дисульфидное равновесие – определяющий фактор резистентности нейронов к нитрозирующему стрессу в условиях ишемии мозга (обзор литературы). *Журнал НАМН України*. Kolesnik YuM, Chekman IS, Belenichev IF, Gorbachyova SV, Gorchakova NA, Bukhtiyarova NV. Thiol-disulfide balance — a determining factor of neuron resistance to nitrosifying stress in conditions of cerebral ischemia (review). *Zhurn Nacion Acad Med Sci Ukraine*. 2013; 19(1):3-11.
16. Korzhov VI. The role of the system of glutathione in the processes of detoxification and antioxidant protection. *Zhurn Nacion Acad Med Sci Ukraine*. 2007; 13(1):3-19.

Submitted: 03.04.17

©PaReAd 2017