

Е.А. Агаджанова *

Ереванский государственный медицинский университет, кафедра эндокринологии, г. Ереван

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА, г. Ереван

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОЗЫ И ИНСУЛИНА НА АКТИВНОСТЬ NOX В КРОВИ БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ И РЕГУЛЯЦИЯ ЕЁ ПОСРЕДСТВОМ ЭМБРИОНАЛЬНОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО МОДУЛЯТОРА

Резюме

У 24 больных СД 1 и 2 типа и 12 здоровых доноров было изучено высвобождение Nox из мембранных образований крови. Показано, что у больных СД высвобождение Nox, по сравнению с донорами, значительно повышается. Это явление более выражено при СД 2 типа, что указывает на большее нарушение стабильности ЭМ и ЭС. Под действием экзогенной глюкозы высвобождение Nox усиливается в большей степени, в частности, из ЭС. Под влиянием инсулина *in vitro* высвобождение Nox в ЭМ и ЭС также увеличивается. На основе полученных данных высказано предположение о возможной роли Nox в качестве рецептора инсулина. Показано, что в мембранных структурах сыворотки больных с СД 1 типа, получавших инсулин, а также при добавлении инсулина в кровь больных СД 2 типа высвобождение Nox было значительно выше, чем у здоровых доноров. В присутствии ЭПОМ высвобождение Nox значительно подавляется, особенно у пациентов с СД 2 типа. Подавление высвобождения изоформ Nox из ЭМ и ЭС у больных СД под влиянием ЭПОМ можно рассматривать в качестве возможного механизма его мембраностабилизирующего действия *in vivo*.

Ключевые слова: сахарный диабет, Nox, глюкоза, инсулин, эмбриональный противоопухолевый модулятор Мкртчяна.

Abstract

In 24 patients with type 1 and 2 diabetes and 12 donors was shown that in diabetes the Nox releasing of membrane of blood formations is significantly enhanced. This phenomenon is more pronounced in type 2 diabetes, indicating a greater violation of the stability of erythrocyte membranes (EM) and serum exosomes (SE). Under the influence of exogenous glucose releasing of Nox is further enhanced to a greater extent, in particular from SE. Influenced insulin *in vitro* releasing Nox in EM and SE also increases in. Based on a number of data, it has been suggested the possible role of Nox as the insulin receptor. It is shown that in the serum membranous structures of patients with type 1 diabetes treated with insulin, as well as the addition of insulin into the blood of patients with type 2 diabetes the releasing of Nox was significantly higher than in healthy donors. In the presence of Embryonal antitumor modulator of Mkrtchyan (EATM) the releasing of Nox is significantly inhibited, especially in patients with type 2 diabetes. Suppression of the Nox isoforms releasing of EM and SE in patients with diabetes under the influence EATM can be considered as a possible mechanism of its membrane stabilizing effect *in vivo*.

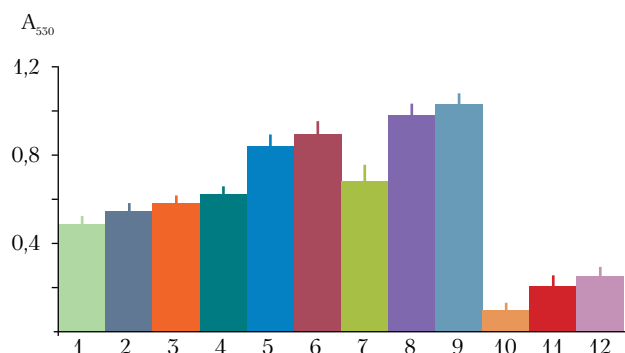
Key words: diabetes mellitus, Nox, glucose, insulin, Mkrtchyan embryonic antitumor modulator.

ЭМ — эритроцитарные мембраны, ЭС — экзосомы сыворотки, ЭПОМ — эмбриональный противоопухолевый модулятор Мкртчяна, СД — сахарный диабет, ПОЛ — перекисное окисление липидов.

При СД гипергликемия и как её следствие окислительный стресс являются главным инициатором развития патологического процесса во многих тканях и, в особенности, в β -клетках [2, 3, 17, 23]. Более того, β -клетки могут особенно сильно испытывать окислительный стресс, поскольку содержат крайне низкий уровень антиоксидантов [18, 32]. Непосредственную связь с развитием окислительного стресса при СД имеют NADPH оксидазы, принадлежащие семейству Nox. Это белки, которые передают электроны через биологические мембраны. В целом акцептором электронов при этом является

кислород, продуктом реакции является супероксид. Поэтому биологической функцией ферментов Nox является производство активных разновидностей кислорода (АФК) [12]. Механизмы активации и распределения в тканях различных их представителей заметно отличаются. Каждая изоформа характеризуется специфической каталитической субъединицей, взаимодействующими белками и субклеточной локализацией. Некоторые изоформы Nox экспрессируются в печени и β -клетках поджелудочной железы, которые и повреждаются при их несоответствующей активации. Авторы считают, что ги-

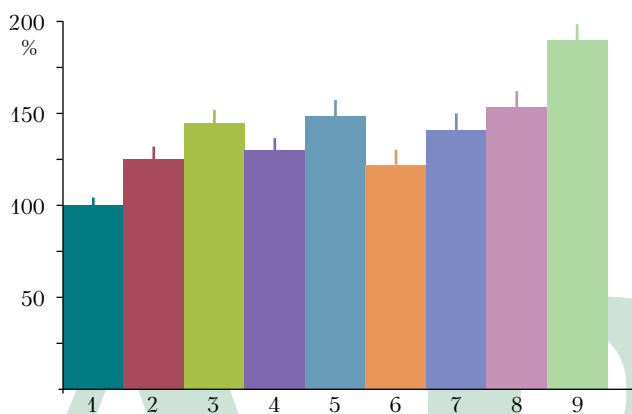
* Контакты. E-mail: eaghajanova@yahoo.com. Телефон: (37494) 47-14-90



Аналогичные показатели для Nox из ЭМ больных СД 1 типа (4), с 9 ммоль (5) и 12 ммоль (6) глюкозы, при СД 2 типа (7), с 9 ммоль (8) и 12 ммоль (9) глюкозы. Показатели для eNox из экзосом сыворотки донорской крови (10), из ЭС при СД 1 типа (11) и 2 типа (12) в присутствии 12 ммоль глюкозы.

Рисунок 1. Удельное содержание Nox из ЭМ и сыворотки крови доноров и больных СД 1 и 2 типов (eNox) после инкубации с 9 и 12 ммоль глюкозы *ex vivo*: 1) кровь доноров без глюкозы; 2) с 9 ммоль глюкозы; 3) с 12 ммоль глюкозы

перглицемический окислительный стресс вследствие активации NADPH оксидазы и в частности его Nox1 изоформа играют ключевую роль в ускоренном развитии диабетического атеросклероза [15]. Nox / АФК-зависимое повреждение β -клеток, как думают авторы, связано с глюколипотоксичностью и, таким образом, приводит к развитию СД 2 типа. В то же время известно, что эритроциты содержат активный рецептор инсулина, что усиливает фосфорилирование тирозиновых остатков некоторых белков, включая 6-фосфофруктозо-1-киназу. Фактически, за счёт специфических рецепторов инсулин проникает в ЭМ, где локализован и Nox, который имеет большое удельное содержание и обладает как NADPH зависимой O_2^- -продуцирующей, так и ферриНв-восстанавливающей активностями [14]. Одна-



Активность Nox из ЭМ донорской крови без глюкозы (1). Активность Nox из ЭМ больных СД 1 типа в присутствии 9 ммоль (2) и 12 ммоль (3) глюкозы. Аналогичные показатели для Nox из ЭМ больных СД 2 типа с 9 ммоль (4) и 12 ммоль (5) глюкозы. Активность eNox из ЭС донорской крови (6), из сыворотки крови больных СД 1 типа (7) и 2 типа с 9 ммоль (8) и 12 ммоль (9) глюкозы соответственно.

Рисунок 2. Относительное изменение NADPH зависимой O_2^- -продуцирующей активности Nox из ЭМ и из сыворотки крови (eNox) больных СД 1 и 2 типа (по сравнению с 100% показателями донорской крови) после их инкубации с 9 и 12 ммоль глюкозы *ex vivo*

ко нам не удалось обнаружить данных относительно непосредственного влияния глюкозы, а также инсулина на ферментные системы Nox в крови у больных СД *ex vivo*.

ЭПОМ [5, 23] оказывает гипогликемическое действие [11], регулирует уровень про- и антиоксидантных металлопротеинов тканей крыс при стрептозотоцин-индуцированном СД [4]. ЭПОМ обладает неферментативной активностью продуцирования супероксидов (O_2^-) в присутствии NADPH (как источника электронов), однако эта активность подавляется изоформами Nox за счёт перехвата электронов, необходимых для образования O_2^- [40]. ЭПОМ не обладает непосредственной антиоксидантной активностью, однако повышает уровень ключевых антиоксидантных ферментов СОД и каталазы *in vivo*, оказывая мембраностабилизирующий эффект. Действительно, антиоксидантные агенты оказывают мембраностабилизирующее действие путём подавления процесса перехода Nox из клеточных мембран в гомогенную фазу. Таким образом, выяснение роли ферментов Nox в повреждении печени и β -клеток должно привести к более углублённому пониманию патомеханизмов СД и поможет наметить новые пути терапии этой патологии.

Цель работы: изучить непосредственное влияние различных концентраций глюкозы и инсулина на рилизинг ферментов Nox в ЭМ и сыворотке крови здоровых доноров и больных СД 1 и 2 типа, а также показать возможное регулирующее влияние ЭПОМ на состояние Nox.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на базе кафедры эндокринологии ЕГМУ и университетской клиники «Мурацан», а также Института биохимии НАН РА (лаб. проф. М.А. Симоняна). В исследовании участвовали 24 донора: 12 — в возрасте $23,4 \pm 1,1$ года, 12 — в возрасте $50 \pm 5,1$ года, а также 12 больных СД 1 типа (давность заболевания $7,2 \pm 2,6$ года, возраст больных $22,4 \pm 1,1$ года) и 12 больных СД 2 типа (давность заболевания $8,1 \pm 2,5$ года, возраст больных $53,4 \pm 3,7$ года).

Для выделения фракций Nox (цитохрома b_{558}) из очищенных ЭМ и сыворотки донорской крови и крови были использованы целлюлоза DE-52 (Whatman, Англия) и сефадекс DEAE A-50 (Pharmacia, Швеция). Для определения O_2^- -продуцирующей активности Nox использовали нитротетразолиевый синий, феназин метасульфат, пирофосфат натрия, NADPH («Sigma»). Для проведения ионообменной хроматографии использовали стеклянную колонку размером 2×25 см со стеклянным фильтром. Оптические спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Specord UV/VIS (Германия), длина оптического пробега 1 см.

Условия проведения эксперимента

Пробы сыворотки и ЭМ исследуемой крови инкубировали в аэробных условиях при 4°C в течение 4 суток, при pH 7,4–8,0 с 0,15 мг/мл ЭПОМ. Для изучения вли-

Таблица 1. Удельная NADPH зависимая O₂⁻-продуцирующая активность Nox и O₂⁻-продуцирующая активность супрола после инкубирования этих белков с инсулином в течение часа при 20°C in vitro (p < 0,05, n = 6)

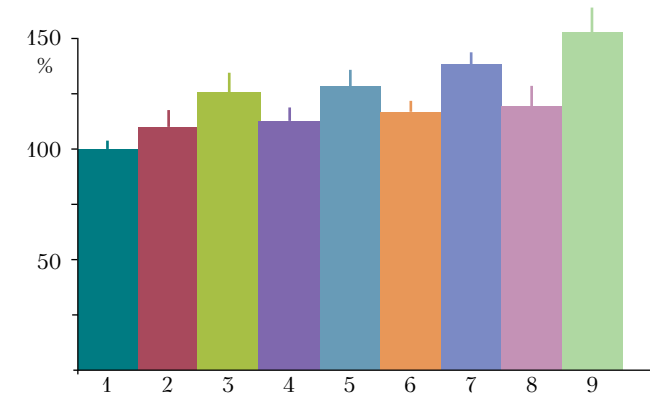
Nox из:	К (доноры)	Инсулин (0,2 IU)	Инсулин (0,4 IU)
Сыворотки крови eNox	26,6 ± 4,1	35,4 ± 4,6	41,3 ± 3,9
ЭМ (гомогенная фаза)	14,2 ± 1,3	18,4 ± 2,4	21,3 ± 3,0
ЭМ (гетерогенная фаза)	16,1 ± 3,3	19,3 ± 2,9	24,5 ± 3,1
Супрол	31,3 ± 3,0	26,4 ± 2,1	21,3 ± 3,2

яния глюкозы в присутствии 2 мкМ ферригемоглобина (ферриHb) во все пробы добавляли соответственно по 9 или 12 ммоль глюкозы. Для изучения влияния инсулина в пробы добавляли 0,2 и 0,4 IU инсулина и инкубировали в течение 1 ч при 20 °С. Далее осуществляли выделение фракций изоформ Nox из этих биосистем [6]. Количество Nox определяли путём измерения плотности максимального оптического поглощения раствора Nox при 530 нм. Удельное содержание Nox определяли из расчёта на 1 мл раствора Nox полученного из 1 мл эритроцитов. Выделение экстрацеллюлярной Nox (eNox) из экзосом сыворотки крови проводили по М.А. Симоняну [9]. Количество eNox определяли путём измерения плотности максимального оптического поглощения раствора eNox при 530 нм. Удельное содержание eNox определяли из расчёта на 1 мл раствора eNox полученного из 1 мл сыворотки. O₂⁻-продуцирующую активность Nox и eNox определяли нитротетразолиевым синим (НТС) методом путём вычисления процента стимулирования образования формазана (при 560 нм) в результате восстановления НТС супероксидными радикалами. За единицу O₂⁻-продуцирующей активности принимали количество белка, которое стимулирует образование формазана на 50%. При этом NADPH зависимую O₂⁻-продуцирующую активность Nox определяли добавлением в реакционную систему NADPN₄ (0,1 мМ) с величиной плотности поглощения Nox (при 530 нм) равной 0,03. Ферригемоглобин (ферриHb)-восстанавливающие активности изоформ Nox определяли, основываясь на том, что при аэробном инкубировании Nox с ферриHb происходит восстановление ферриHb до ферроHb. За единицу ферриHb-восстанавливающей активности принимали количество Nox, вызывающее снижение плотности α-поглощения ферриHb до 0,05 в течение 30 мин при 20 °С [4]. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента–Фишера с определением критерия достоверности p.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования свидетельствуют, что глюкоза в приведённых количествах практически не вызывает изменение форм и максимумов оптического поглоще-

ния спектров Nox. Однако эти Nox несколько отличаются по величинам оптических спектральных индексов в окисленном (A₄₁₂/A₅₆₀) и в восстановленном дитионитом натрия состояниях (A₄₁₈/A₅₅₈). Это свидетельствует об имеющихся некоторых отличиях в окислительно-восстановительных характеристиках ферментов. С другой стороны, глюкоза дозозависимо стимулирует рилизинг Nox из ЭМ и eNox из ЭС крови доноров и, в особенности, из ЭМ и ЭС крови больных СД 1 и 2 типа (рис. 1). На этом фоне величина высвобождения Nox из ЭМ донорской крови под влиянием 9 и 12 ммоль глюкозы повышена соответственно на 22,3 ± 2,1% (p = 0,001, n = 12) и 28,8 ± 4,3% (p = 0,01, n = 12) (рис. 1). В свою очередь, в этих условиях при СД 1 типа высвобождение Nox под влиянием 9 и 12 ммоль глюкозы также усилено, соответственно на 33,1 ± 2,7% (p = 0,005, n = 12) и 41,6 ± 3,8% (p = 0,01, n = 12), а при СД 2 типа на 38,4 ± 4,7% (p = 0,003, n = 12) и 46,1 ± 5,7% (p = 0,001, n = 12). Что касается высвобождения eNox из ЭС крови под влиянием 9 и 12 ммоль глюкозы, то при СД 1 и 2 типа она усилилась более чем в 2 и 2,5 раза соответственно (p = 0,001) (рис. 1). Эти данные свидетельствуют о том, что эффективная концентрация глюкозы составляет 9–9,5 ммоль. С другой стороны, под влиянием экзогенной глюкозы высвобождение Nox из ЭМ и eNox из ЭС крови при СД 2 типа несколько превышает аналогичный показатель при СД 1 типа. При этом глюкоза в большей степени повышает рилизинг eNox из экзосом сыворотки крови. Направленность изменения NADPH-зависимой O₂⁻-продуцирующей и ферриHb-восстанавливающей активностей изоформ Nox из ЭМ и eNox из ЭС крови больных СД 1 и 2 типа практически совпадают с направлением изменения удельного содержания изоформ Nox. С другой стороны, в большей степени повышается активность eNox (рис. 2, 3). Это свидетельствует о большей уязвимости ЭС, об их большей чувствительности к воздействию глюкозы.



Активность Nox из ЭМ донорской крови без глюкозы (1). Активность Nox из ЭМ больных СД 1 типа с 9 ммоль (2) и 12 ммоль (3) глюкозы. Аналогичные показатели для Nox из ЭМ больных СД 2 типа с 9 ммоль (4) и 12 ммоль (5) глюкозы. Активность eNox из ЭС донорской крови (6), из ЭС крови больных СД 1 типа (7) и 2 типа с 9 ммоль (8) и 12 ммоль (9) глюкозы соответственно.

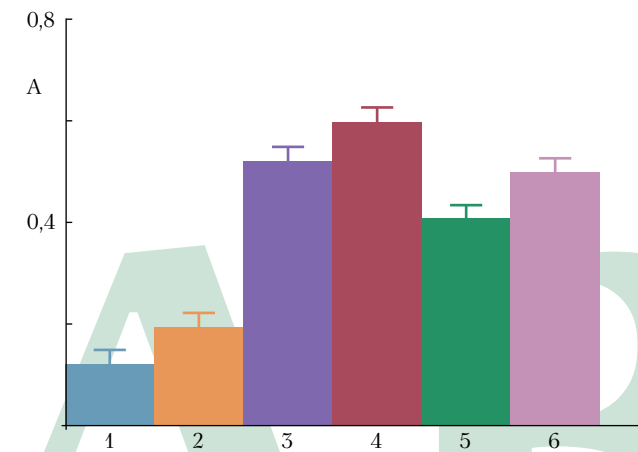
Рисунок 3. Относительное изменение ферри Hb-восстанавливающей активности Nox из ЭМ и из ЭС крови (eNox) больных СД 1 и 2 типов (по сравнению с 100% показателями донорской крови) после их инкубации с 9 и 12 ммоль глюкозы ex vivo

Таблица 2. Удельная ферриHb восстанавливающая активность Nox и eNox после инкубирования этих белков с инсулином, в течение часа при 20°C *in vitro* ($p < 0,05, n = 6$)

Nox из:	К (доноры)	Инсулин (0,2 IU)	Инсулин (0,4 IU)
Сыворотки крови (eNox)	15,7 ± 2,2	17,2 ± 2,8	19,6 ± 3,1
ЭМ (гомогенная фаза)	12,3 ± 2,1	16,5 ± 3,0	18,3 ± 2,1
ЭМ (гетерогенная фаза)	16,7 ± 2,1	20,2 ± 2,9	22,6 ± 3,1

Под влиянием инсулина в приведённых условиях *in vitro* NADPH зависимая O₂⁻-продуцирующая и ферриHb-восстанавливающая активности eNox и Nox повышаются не только в гомогенной фазе (в растворе), но и в гетерогенной фазе в ЭМ (для Nox) (табл. 1, 2). При этом активность супероксид-продуцирующего белка супрола снижается под влиянием инсулина. По-видимому, снижение уровня ПОЛ в сыворотке крови под влиянием инсулина связано с подавлением O₂⁻-продуцирующей активности супрола инсулином. Это, несомненно, положительное явление, т.к. предотвращается самоагрегация супрола и, соответственно, изменение вязкости сыворотки, что в целом предотвращает нарушение микроциркуляции крови.

Положительным действием инсулина можно считать и существенное увеличение ферриHb-восстанавливающей активности Nox и eNox как фактора улучшения кислородного гомеостаза. Почти аналогичный эффект инсулина на активность Nox в гомогенной и гетерогенной фазах (в ЭМ) свидетельствует о том, что инсулин имеет «свободный» доступ через ЭМ, при этом у диабетиков текучесть и проницаемость ЭМ повышается [14] и инсулин может входить в контакт с Nox.



Плотность максимального оптического поглощения супрола (при 430 нм) сыворотки донорской крови (5) и супрола сыворотки крови больных СД, леченых инсулином (6).

Рисунок 4. Плотность максимального оптического поглощения (при 530 нм) eNox из сыворотки донорской крови (1) и сыворотки крови больных, леченых инсулином (2), Nox из ЭМ донорской крови (3) и Nox из ЭМ больных, леченых инсулином (4)

Фактически увеличение уровня NADPH зависимой O₂⁻-продуцирующей и ферри Hb-восстанавливающей активности eNox и Nox наблюдается и в крови больных СД (табл. 3, 4; рис. 4) *in vivo*. При этом инсулин не изменяет оптико-спектральных показателей eNox и Nox *in vitro* и *in vivo*.

Можно констатировать, что активирование инсулином ферментных систем эритроцитов, ответственных за поддержание энергетического баланса, связано с повышением уровня и активности O₂⁻, продуцируемых Nox. Можно предполагать, что Nox является рецептором инсулина, который активирует Nox путём фосфорилирования соответствующего домена (возможно, тирозиновые остатки) молекулы Nox [30]. Динамика изменения уровня и активности супрола *in vitro* и *in vivo* практически не изменяются.

Увеличение O₂⁻-продуцирующей активности Nox инсулином есть нормальный физиологический процесс. Инсулин обеспечивает соответствующий уровень супероксидного аниона в β-клетках поджелудочной железы путём связывания и активирования локализованной там Nox для стимуляции секреции инсулина этими клетками [16]. Фактически, стимулирование активностей Nox и eNox инсулином связано с непосредственным взаимодействием инсулина с этими ферментами-гемопротеинами крови человека, возможно, путём фосфорилирования тирозиновых остатков этих Nox.

Результаты исследования влияния ЭПОМ на изоформы Nox показало, что при 4-дневной аэробной инкубации ЭМ донорской крови и крови больных СД 1 и 2 типа с ЭПОМ в условиях pH близким к физиологическим (pH 8) наблюдается различной степени высвобождение изоформы NADPH оксидазы (Nox) кислой природы в гомогенную фазу (в раствор). Причём формы оптических спектров Nox, отщепленных вследствие инкубации с ЭПОМ и без него, практически не отличаются. Как следует из рис. 5, формы оптических спектров высвобожденных Nox практически идентичны для ЭМ из донорской крови и крови пациентов с СД типа 1 и 2, в отсутствие и присутствие ЭПОМ. Это свидетельствует о том, что ЭПОМ не нарушает структуры Nox ЭМ человека. При этом степень отщепления Nox из ЭМ при СД типа 2 и 1 выше на 83,3 ± 7,4% ($p = 0,01, n = 12$) и 58,4 ± 6,5% ($p = 0,003, n = 12$) соответственно, по сравнению с отщеплением Nox из ЭМ донорской крови. Если учесть, что

Таблица 3. Удельная NADPH зависимая O₂⁻-продуцирующая активность eNox и Nox и O₂⁻-продуцирующая активность супрола из донорской крови и крови пациентов СД при лечении инсулином ($p < 0,05, n = 6$)

Nox из:	К (доноры)	СД +инсулин
Сыворотки крови (eNox)	26,6 ± 4,1	40,3 ± 5,6
ЭМ	14,2 ± 1,3	21,4 ± 2,1
Супрол	31,3 ± 3,0	25,4 ± 2,9

Таблица 4. Удельная ферриHb-восстанавливающая активность eNox и Nox из донорской крови (К) и крови пациентов СД при лечении инсулином ($p < 0,05, n = 6$)

Nox из:	К (доноры)	СД + инсулин
Сыворотки крови (eNox)	15,7 ± 2,2	18,5 ± 1,4
ЭМ	12,3 ± 1,2	16,5 ± 1,1

определённое количество Nox локализовано на поверхности мембран клеток различной модификации [19], то можно предположить, что в этих условиях происходит не полное, а частичное отщепление Nox из ЭМ. Отщепляется только локализованная на поверхности ЭМ Nox (полное отщепление Nox из ЭМ происходит в экстремальных условиях) [13]. При этом ЭПОМ подавляет релизинг Nox из ЭМ при СД 2 и 1 типа и донорской крови на $45,5 \pm 6,2\%$, $31,6 \pm 4,4\%$ и $25,1 \pm 3,7\%$ ($p = 0,001, n = 12$) соответственно. Таким образом, подавление релизинга Nox из ЭМ под влиянием ЭПОМ наиболее выражено при СД 2 типа. Это свидетельствует о том, что при СД 2 типа стабильность ЭМ нарушена в большей степени, чем при СД 1 типа.

Установлено, что подавление процесса отщепления Nox из ЭМ ЭПОМ-ом происходит дозависимым путём. При этом наиболее эффективная концентрация ЭПОМ для подавления релизинга Nox из ЭМ *ex vivo* составляет 0,15 мг/мл.

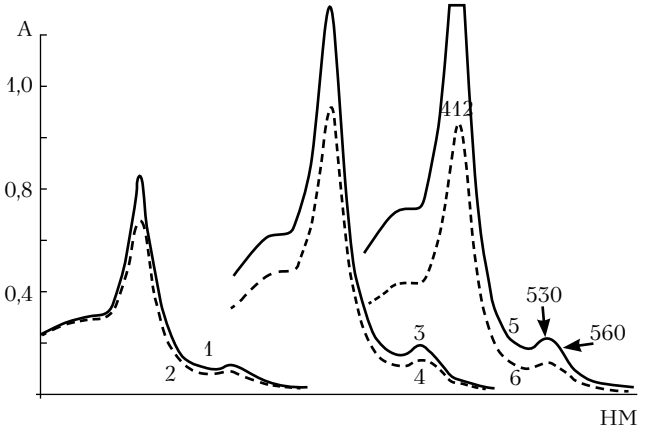
Аналогичное явление наблюдается и с eNox. При аэробной инкубации сыворотки донорской крови и крови пациентов с СД 1 и 2 типа в присутствии $1,5 \cdot 10^{-5}$ М гемоглобина с добавлением ЭПОМ и без него также наблюдается различной интенсивности релизинг eNox (по-видимому, из экзосом, локализованных в сыворотке крови) [26]. При этом форма оптических спектров высвобожденных eNox в сыворотке донорской крови и крови больных СД 1 и 2 типа с добавлением ЭПОМ и без него практически не отличаются (рис. 6). Полученные данные также свидетельствуют об отсутствии какого-либо искажающего эффекта ЭПОМ и на eNox, высвобожденных из сыворотки крови человека. При этом прирост отщеплённых eNox из сыворотки крови при СД 2 и 1 типа соответственно выше на $109,2 \pm 8,7,4\%$ ($p = 0,02, n = 12$) и $45,4 \pm 5,5\%$ ($p = 0,001, n = 12$), по сравнению с показателями eNox из сыворотки донорской крови. Под влиянием ЭПОМ релизинг eNox из сыворотки крови пациентов при СД 2 и 1 типа и донорской крови подавляется соответственно на $47,9 \pm 4,4\%$, $31,3 \pm 2,9\%$ и $29,3 \pm 3,2\%$ ($p = 0,001, n = 12$). В большей степени подавление релизинга eNox ЭПОМ-ом также отмечено в сыворотке крови больных СД 2 типа.

Проведённое исследование свидетельствует, что при СД 2 типа стабильность ЭМ и экзосом ослаблена в большей степени, чем при СД 1 типа. При этом ЭПОМ не оказывает отрицательного воздействия не только на Nox из ЭМ, но и на eNox сыворотки крови человека. Подавление процесса высвобождения eNox осуществляется до-

зозависимым путём (рис. 7), причём эффективная концентрация ЭПОМ для подавления релизинга eNox из сыворотки крови *ex vivo* также составляет 0,15 мг/мл.

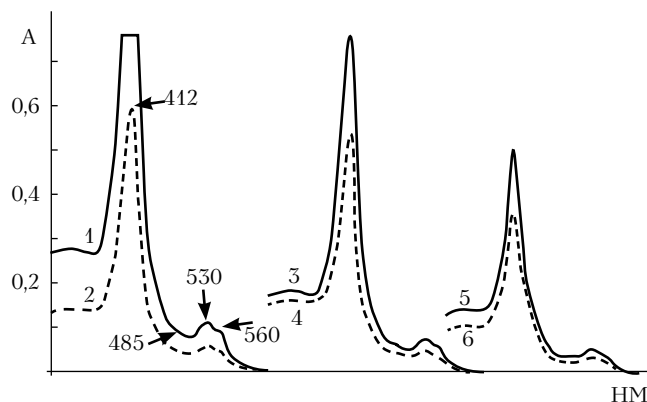
Механизм усиления высвобождения изоформ Nox из ЭМ и из ЭС крови в присутствии ферриHb при СД может быть, по аналогии с клетками мозговой ткани, обусловлен дестабилизацией клеточных мембран, которое возникает вследствие связывания ферриHb с поврежденными участками (в результате липидной перекисидации) поверхности клеточных мембран, включая ЭМ и экзосомы [7], с образованием нестабильного комплексного соединения между железом гемоглобина и NO в составе Nox [4]. В результате этого формируется нитрозо-гемоглобин, что облегчает выход Nox и eNox из гетерогенной фазы (из клеточных мембран или экзосом [36]) в гомогенную — растворимую фазу. Аналогичные изменения с высвобождением Nox наблюдаются при различных патологических состояниях, как то: интоксикация солями тяжёлых металлов [8], злокачественные новообразования [9] и др.

Эффект экзогенной глюкозы на процесс высвобождения изоформ Nox имеет двоякий характер. С одной стороны, глюкоза стимулирует перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот в ЭМ [24], способствуя высвобождению Nox и, связываясь с определённым доменом в составе молекулы Nox, защищает последнюю от повреждающих эффектов образующихся гидроксильных радикалов. Следует учесть, что глюкоза является эффективным сквенджером гидроксильных радикалов при неферментативном расщеплении перекиси водорода, в ходе которого образуются супероксиды [29]. Аналогичным механизмом (путём соединения с определённым доменом молекулы Nox) действует и галармин из нейросекреторных гранул гипоталамуса, который так-



Спектры поглощения Nox: из ЭМ донорской крови (1, 2), из ЭМ крови пациентов при СД 1 типа (3, 4) и 2 типа (5, 6). На примере 5 приведены характерные для Nox максимальные оптические поглощения при 560, 530 и 412 нм (в окисленном состоянии), которые идентичны для остальных спектров Nox.

Рисунок 5. Оптические спектры поглощения высвобожденных Nox из ЭМ крови больных СД 1 и 2 типов и здоровых доноров после 4-дневного аэробного инкубирования их водных смесей при 4°С и рН 8 в отсутствие (сплошные линии) и в присутствии (пунктирные линии) 0,15 мг/мл ЭПОМ



Спектры поглощения eNox из сыворотки крови пациентов при СД 2 типа (1, 2) и 1 типа (3, 4) и донорской крови (5, 6). На примере спектра 1 приведены характерные для eNox максимальные оптические поглощения при 560, 530 и 485 и 412 нм (в окисленном состоянии), которые идентичны для остальных спектров eNox. Спектры поглощения eNox из сыворотки крови пациентов при СД 2 типа (1, 2) и 1 типа (3, 4) и донорской крови (5, 6). На примере спектра 1 приведены характерные для eNox максимальные оптические поглощения при 560, 530 и 485 и 412 нм (в окисленном состоянии), которые идентичны для остальных спектров eNox.

Рисунок 6. Оптические спектры поглощения отщеплённых eNox из сыворотки крови больных СД 1 и 2 типов, а также здоровых доноров после 4-дневной аэробной инкубации при 4°C и pH 8 в отсутствие (сплошные линии) и присутствии (пунктирные линии) 0,15 мг/мл ЭПОМ

же защищает Nox от оксидативного повреждения, вызванного гидроксид-радикалами, путём восстановления последних. При этом Nox выступает в качестве рецептора для галармина [28]. Следуя этой логике, Nox, по-видимому, может являться рецептором и для глюкозы, присоединять небольшие её количества. С другой стороны, изоформы Nox являются флавиносодержащими гликопротеинами, и не исключается, что экзогенная глюкоза может восстановить потерю части углеводов в составе молекулы Nox, сохраняя нативность, соответственно, и активность Nox. Получается, что низкие концентрации глюкозы оказывают положительный эффект, тогда как высокие концентрации — повреждающий эффект, путём стимуляции липидной перекисидации и дестабилизации клеточных мембран, включая ЭМ и мембраны ЭС. В свою очередь, ослабление стабильности ЭМ индуцирует высвобождение изоформ Nox, которые локализованы на поверхностных участках клеточных мембран и являются их структурно-функциональными компонентами [24]. Таким образом, можно предположить, что при СД 1 и, особенно, 2 типа, если при низких концентрациях глюкозы связывается с изоформами Nox на ЭМ и ЭС (которые, возможно, при низкой концентрации глюкозы являются её рецепторами), то при высоких концентрациях глюкозы, наоборот, понижает стабильность ЭМ и ЭС, показателем чего является высвобождение Nox из этих биосистем. Последнее, увеличивая продукцию АФК, ещё более усугубляет дестабилизацию биомембран. Получается замкнутый процесс, который необходимо прервать, используя мембраностабилизирующие средства.

Проведённое нами исследование по выявлению влияния ЭПОМ на рилинг Nox из мембранных образований эритроцитов и сыворотки крови больных СД 1 и 2 типа *ex vivo* показало, что формы оптических

спектров поглощения отщеплённых из соответствующих мембран Nox и eNox практически не изменяются как при СД 1, так и 2 типа, в отсутствие и присутствии ЭПОМ, по сравнению с показателями донорской крови. Нами установлено, что удельное содержание отщеплённых Nox и eNox повышается не только при стрептозотоцин-индуцированном СД у крыс [42], но и при СД 1 и 2 типа у человека. ЭПОМ подавляет процесс отщепления оксидаз, оказывая стабилизирующий эффект на ЭМ и ЭС. Последние, будучи наночастицами, могут переходить из клетки в кровь при различных патологических состояниях, в том числе при СД [26]. Повышенный уровень малонового диальдегида (МДА) в крови при СД [14] отражает адекватное увеличение ПОЛ, в том числе и в экзосомах. Повышение уровня МДА в биологических мембранах (ЭМ, ЭС) приводит к адекватному увеличению текучести этих мембран и облегчает процесс высвобождения Nox и eNox из гетерогенной фазы в гомогенную фазу (в раствор). Хотя ЭПОМ сам по себе не имеет антиоксидантной активности, он увеличивает активность ключевых антиоксидантных ферментов, которые расположены не только в цитоплазме, но и в клеточных мембранах. Таким образом, ЭПОМ проявляет мембраностабилизирующий эффект, опосредованно подавляя ПОЛ [11, 33]. Этим он напоминает галармин, который обладает антиоксидантным и антистрессорным действием путём улавливания высокотоксичных гидроксильных радикалов [31]. Изоформы Nox, будучи рецепторами галармина, играют роль иммуностимулятора и проявляют мембраностабилизирующий эффект, подавляя ПОЛ биологических мембран [27]. По нашим предварительным данным, изоформы Nox могут также служить в качестве рецептора инсулина. Если принять это за основу, то становится ясно, что высвобождение Nox у больных СД снижает концентрацию функционально активных рецепторов в мембранах клеток, в том числе и в β -клетках. Это, в свою очередь, тормозит процесс сигнальной трансдукции, активацию внутриклеточных тирозинкиназ и, наконец, активацию гексокиназы (глюкокиназы), одного из ключевых ферментов гликолиза [25]. Глюкокиназа определяет уровень метаболизма глюкозы в β -клетках в качестве центрального регулятора глюкозо-стимулированной секреции инсулина. Ее отсутствие уменьшит поток глюкозы в β -клетки и, следовательно, приведет к снижению секреции инсулина и повышению уровня глюкозы в крови [20]. ЭПОМ подавляет высвобождение Nox из различных мембранных структур и восстанавливает механизм сигнальной трансдукции инсулина, тем самым обеспечивая эугликемию. Если принять во внимание, что изоформы Nox являются важными структурными и функциональными компонентами ЭМ, ЭС и мембран клеток иммунной системы [13, 19], то увеличение их высвобождения с усилением ПОЛ (при СД 1 и, в особенности, 2 типа) соответственно разрушает эти мембраны, что является возможным механизмом дестабилизации биологических мембран. Подавление процесса высвобождения изоформ Nox из ЭМ и экзосом у больных СД 1 и 2 типа под влиянием ЭПОМ может рассматриваться в каче-

стве возможного механизма его мембраностабилизирующего эффекта *ex vivo*. Эти данные создают основу для терапевтического применения ЭПОМ у больных СД 1 и, в особенности, 2 типа *in vivo*.

А

Список литературы

1. Агаджанова Е.М., Симонян М.А. Влияние эмбрионального противоопухолевого модулятора на уровень и активность металлопротеинов у крыс при стрептозотоциновом диабете // Медицина, наука и образование. 2011. № 9. С. 13–17.
2. Аметов А.С., Соловьёва О.Л. Окислительный стресс при сахарном диабете 2 типа и пути его коррекции // Проблемы эндокринологии. 2011. № 6. С. 52–56.
3. Дедов И.И., Балаболкин М.И., Мамаева Г.Г. Сахарный диабет: ангиопатии и окислительный стресс. Пособие для врачей. М., 2003, 86 с.
4. Мелконян Л.Г. Симонян Р.М., Секоян Э.С., Симонян М.А. Изменение NADPH-зависимой супероксид-продуцирующей и ферриНб-восстанавливающей активности цитохрома b558 из мембран клеток селезёнки и эритроцитов, индуцированные излучением различной природы // ДНАН РА. 2009. № 109 (3). С. 225–235.
5. Мкртчян Л.Н. Эмбриональный противоопухолевый модулятор Мкртчяна. Патент РФ № 2240810. Январь 2004 г.
6. Симонян Г.М., Симонян Р.М., Симонян М.А. Способ получения цитохромов b из мембран эритроцитов. Лицензия изобрет № 908 Армпатента. Ереван. 2001.
7. Симонян Р.М., Галоян К.А., Г.М.Симонян, Хачатрян А.Р., Бабаян М.А., Оксюзян Г.Р., Симонян М.А. Ферригемоглобин индуцирует рилизинг NADPH-оксидазы мозговой ткани *ex vivo*: подавление этого процесса галармином // Нейрохимия. 2013. № 30 (3). С. 1–5.
8. Сиракян М.С., Симонян Г.М., Бабаян М.А., Симонян М.А. Характерные изменения уровня и активности антиоксидантных и прооксидантных металлопротеинов крови крыс при острой интоксикации ионами кальция // Вестник МАНЭБ. СПб., 2006. № 11 (3). С. 192–198.
9. Фесчан С.М., Симонян Р.М., Енгибарян А.А., Симонян М.А. Роль гемоглобина в процессе появления экстрацеллюлярной NADPH оксидазы в сыворотке донорской крови и асцитной жидкости яичника женщин // Вопр. теорет. клин. мед. 2012. № 15 (4). С. 12–16.
10. Aghajanova M.I., Vahedian V., Aghajanova E.M., Mkrтчян L.N., Simonyan M.A. NADPH-dependent superoxide producing activity of the embryonic anti-tumor modulator (EATM) and inhibition of this activity by isoforms of NADPH-oxidases // Медицина, наука и образование. 2011 № 8. Р. 4–8.
11. Aghajanova Y.M. Preventive antidiabetic action of Embryonal antitumor modulator of Mkrтчян (EATM) // 3rd Internat. medical congress of Armenia. Together to Health. Yerevan. 2011. Vol. 93. P. 73.
12. Bedard K., Krause K.-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology // Physiol. Rev. 2007. Vol. 87, № 1. P. 245–313.
13. Cho N., Morre D.J. Early developmental expression of a normally tumor-associated and drug-inhibited cell surface-located NADH oxidase (ENOX2) in non-cancer cells // Cancer Immunol. Immunother. 2009. Vol. 58, № 4. P. 547–552.
14. Ferrera A., Rivera A., Romero J.R. Na/Mg exchange in functionally coupled to the insulin receptor // J. Cell Physiol. 2004. Vol. 199, № 3. P. 434–440.
15. Gray S.P., Marco E.D., Okabe J., Szyndralewicz C., Heitz F., Montezano A.C. et al. NADPH Oxidase 1 plays a key role in diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis // Circulation. 2013. Vol. 127. P. 1888–1902.
16. Ishizuka T., Hinata T., Watanabe Y. Superoxide induced by a high-glucose concentration attenuates production of angiogenic growth factors in hypoxic mouse mesenchymal stem cells // J. Endocrinol. 2011. Vol. 208, № 2. P. 147–159.
17. Kangralkar V.A., Patil S.D., Bandivadekar R.M. Oxidative stress and diabetes: a review // Int. J. Pharm. Applic. 2010. Vol. 1, № 1. P. 38–45.
18. Lenzen S., Drinkgern J., Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues // Free Radic. Biol. Med. 1996. Vol. 20, № 3. P. 463–466.
19. Loehneysen K., Noak D., Wood M.R., Friedman J.S., Knaus U.G. Structural inside into Nox4 and Nox2: motifs involved in function and cellular localization // Mol. Cell Biol. 2010. Vol. 30, № 4. P. 961–975.
20. Magnuson M.A., Kahn C.R. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction // Mol. Cell. 2000. Vol. 6. P. 87–97.
21. Marar T. Amelioration of glucose induced hemolysis of human erythrocytes by vitamin E // Chem. Biol. Interact. 2011. Vol. 193, № 2. P. 149–153.
22. Mkrтчян L.N. On a new strategy of preventive oncology // Neurochem. Res. 2010. Vol. 35. P. 868–874.
23. Moussa S.A. Oxidative stress in diabetes mellitus // Romanian J. Biophys. 2008. Vol. 18, № 3. P. 225–236.
24. Nandhini T.A., Anuradha C.V. Inhibition of lipid peroxidation, protein glycation and elevation of membrane ion pump activity by taurine in RBC exposed to high glucose // Clin. Chim. Acta. 2003. Vol. 336, № 1–2. P. 129–135.
25. Porat Sh., Weinberg-Corem N., Tornovsky-Babaev Sh., Schyr-Ben-Haroush R. et al. Control of pancreatic β -cell regeneration by glucose metabolism // Cell. Metabol. 2011. Vol. 13. P. 440–449.
26. Rupp A.K., Rupp C., Keller S., Brase J.C., Ehehalt R. et al. Loss of EpCAM expression in breast cancer derived serum exosomes: role of proteolytic cleavage // Gyn. Oncol. 2011. Vol. 122, № 2. P. 437–446.
27. Simonyan G.M., Simonyan R.M., Simonyan M.A., Galoyan A.A. Stimulation of the NADPH-dependent O_2^- -producing and methemoglobin reducing activities of new isoforms of cytochromes b558 by PRP-1 and Gx-NH2 // Neurochem. Res. 2008. Vol. 33. P. 153–156.
28. Simonyan G.M., Galoyan K.A., Simonyan R.M., Simonyan M.A., Galoyan A.A. Proline rich polypeptide (PRP-1) increases the superoxide-producing and ferrihemoglobin reducing activities of cytochrome b558 isoforms from human lymphosarc. tissue cells // Neurochem. Res. 2011. Vol. 36, № 5. P. 739–745.
29. Simonyan M.A. Reduction of some organic and inorganic oxidants in alkaline media by superoxide dismutase and scaveng. of hydroxy radic // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1982. Vol. 108, № 4. P. 1751–1756.
30. Takahashi S., Kimura S., Kaya H., Iizuka A., Wong H.L., Shimamoto K., Kuchitsu K. Reactive oxygen species production and activation mechanism of the rice NADPH oxidase OsRbohB // J. Biochem. 2012. Vol. 152, № 1. P. 37–43.
31. Tavadyan L.A., Galoian K.A., Harutunyan L.A., Tonikyan H.G., Galoyan A.A. Antioxidant and electron donating function of hypothalamic polypeptides: galarmin and Gx-NH2 // Neurochem. Res. 2010. Vol. 35, № 6. P. 947–952.
32. Tiedge M., Lortz S., Drinkgern J., Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells // Diabetes. 1997. Vol. 46, № 11. P. 1733–1742.
33. Vahedian V., Aghajanova Y.M., Simonyan M.A., Aghajanova M.I. The preventive effect of embryonic antitumor modulator (EATM) on the level and activity of metalloproteins in rats with streptozotocin-induced diabetes // The New Armenian Med. J. 2011. Vol. 4, № 4. P. 57–63.

Авторы заявляют, что данная работа, её тема, предмет и содержание не затрагивают конкурирующих интересов.