



УДК 577.156:612.015

Нейропротекторні ефекти α -ліпоєвої кислоти на розвиток окисного стресу й астрогліозу у мозку СТЗ-діабетичних щурів

С.В. Кириченко, І.В. Прищеп, В.С. Лагода, М.О. Велика, В.С. Недзвецкий

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

Досліджено вплив стрептозотозин-індукованого діабету на розвиток окисного стресу в нервовій тканині, стан гліальних проміжних філаментів, показано протекторний вплив α -ліпоєвої кислоти. У мозку щурів із стрептозотозин-індукованим діабетом визначено достовірне зростання вмісту продуктів перекисного окислення ліпідів. Зміни поліпептидного складу гліального фібрилярного білка виявлено в гіпокампі та корі великих півкуль. У гіпокампі щурів із гіпертиреозом відмічається збільшення інтенсивності поліпептидних зон як розчинної, так і філаментної форм гліального фібрилярного кислого білка. Виявлено високий ступінь кореляції між вмістом ГФКБ і рівнем продуктів перекисного окиснення. Ці дані вказують на важливу роль окисного стресу в індукції астрогліальної реактивної відповіді за умов розвитку діабетичної енцефалопатії. Отримані результати вказують на можливість реконструкції цитоскелета гліальних клітин під протекторним впливом α -ліпоєвої кислоти.

Ключові слова: стрептозотозин-індукований діабет; окисний стрес; гліальні проміжні філаменти; α -ліпоєва кислота

Neuroprotective effects of α -lipoic acid on the development of oxidative stress and astrogliosis in the brain of STZ-diabetic rats

S. Kyrychenko, I. Prishchepa, V. Lagoda, M. Velika, V. Nedzvetsky

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

The aim of this study was to examine whether the antioxidant alpha-lipoic acid protects neurons from diabetic-reperfusion injury. The streptozotocin (STZ) rat model was used to study the glial reactivity and prevention of gliosis by alpha-lipoic acid (alpha-LA) administration. The expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) was determined, as well as lipid peroxidation (LPO) and glutathione (GSH) levels in some brain tissues. We observed significant increasing of lipid peroxidation products in both hippocampus and cortex. Changes of polypeptide GFAP were observed in hippocampus and cortex. Both soluble and filamentous forms of GFAP featured the increase in hippocampus of rat with hyperthyreosis. In the filament fractions, increase in the intensity of 49 kDa polypeptide band was found. In the same fraction of insoluble cytoskeleton proteins degraded HFKB polypeptides with molecular weight in the range of 46–41 kDa appeared. Marked increase of degraded polypeptides was found in the soluble fraction of the brain stem. The intensity of the intact polypeptide – 49 kDa, as well as in the filament fraction, significantly increased. It is possible that increasing concentrations of soluble subunits glial filaments may be due to dissociation of own filaments during the reorganization of cytoskeleton structures. Given the results of Western blotting for filament fraction, increased content of soluble intact 49 kDa polypeptide is primarily the result of increased expression of HFKB and only partly due to redistribution of existing filament structures. Calculation and analysis of indicators showed high correlation between the increase in content and peroxidation products of HFKB. These results indicate the important role of oxidative stress in the induction of astroglial response under conditions of diabet encephalopathy. Administration of alpha-LA reduced the expression both of glial and neuronal markers. In addition, alpha-LA significantly prevented the increase in LPO levels found in diabetic rats. GSH levels increased by the administration of alpha-LA. This study suggests that alpha-LA prevents neural injury by inhibiting oxidative stress and suppressing reactive gliosis. All these changes were clearly counteracted by alpha-lipoic acid. The results of this study demonstrate that alpha-lipoic acid provides for protection to the GFAP, as a whole, from diabet-reperfusion injuries.

Keywords: streptozotocin (STZ); alpha-lipoic acid (alpha-LA); glial fibrillary acidic protein; lipid peroxidation

Вступ

Білки проміжних філаментів розглядаються як надійні гістоспецифічні маркери. У нервовій тканині проміжні філаменти представлені триплетом білків нейрофіламентів та гліальним фібрилярним кислим білком (ГФКБ). ГФКБ є головним структурним компонентом проміжних філаментів астроцитарного цитоскелета, розглядається як надійний маркер астроцитів. Реакція астроцитів на дію факторів, що ушкоджують нервові клітини, супроводжується посиленням синтезом ГФКБ й інтенсивним фібрилогенезом. Існують дані про зміну структури проміжних філаментів і фізико-хімічних властивостей цитоскелетних білків при патологіях різної етіології та дії ушкоджувальних факторів (Eng et al., 2000). Рівень ГФКБ використовується для оцінки розподілу гліальних клітин у відповідь на нейрональне ушкодження. Існують дані про те, що ГФКБ необхідний для підтримання стабільної морфології астроцитів, формування гліального рубця та модуляції гліально-нейрональної взаємодії в нормі та при нейропатіях різної природи (Lerekhin, 2001). ГФКБ залучається до реакції астроцитів на нейрональне ушкодження, що може відігравати роль у морфогенезі центральної нервової системи (Enns et al., 2007).

Антиоксиданти розглядаються як потенційні протектори у захисті від розвитку оксидативного стресу. Вивчено властивості α -ліпоєвої кислоти як біологічного антиоксиданта та пастки для вільних радикалів (Detru, 2006). Тканини центральної нервової системи та периферичних нервів здатні поглинати α -ліпоєву кислоту. Продемонстровано антиоксидантний ефект цієї кислоти у разі використання таких прооксидантів як гідроксидрадикал, гіпохлорна кислота, перекис водню, синглетний кисень, закис азоту та пероксинітрил (Rose, 2006; Bernal, 2007). Недавно запропоновано використання α -ліпоєвої кислоти як терапевтичного агента-антиоксиданта у лікуванні низки нейродегенеративних захворювань (Enns et al., 2007). Мета даної статті – подальше вивчення антиоксидантних властивостей α -ліпоєвої кислоти та її впливу на рівень гліальних маркерів у мозку щурів в умовах щоденного споживання протягом 45 діб після індукції неконтрольованого діабету.

Матеріал і методи досліджень

У дослідженні використано 45 білих щурів-самців лінії Вістар, масою 190–230 г. Спочатку формували дві групи. Тваринам першої групи інтраперитонеально (одноразово) вводили розчинений у натрій-цитратному буфері (рН 4,5) стрептозотоцину (СТЗ) («Sigma», США) у дозі 50 мг/кг маси тварин. Вміст глюкози визначали за 3 доби після ін'єкції. Для подальшого проведення експерименту відбирали тварин із рівнем глюкози понад 250 мг/100 мл. Цих щурів випадковим чином поділяли на дві групи. Тваринам першої групи робили щоденні інтраперитонеальні ін'єкції α -ліпоєвої кислоти в дозі 100 мг/кг (група α -ЛК, $n = 15$) протягом 6 тижнів, тваринам другої групи вводили буфер (група СТЗ, $n = 15$). Тваринам контрольної групи ($n = 15$) робили ін'єкції

ЗФР. Масу тварин і рівень розвитку діабету контролювали за 6 тижнів до завершення експерименту.

Після декапітації вилучали головний мозок, охолоджували та розділяли на відділи. 0,2 г тканини (головний мозок загалом, кора великих півкуль, мозочок, середній мозок) гомогенізували в 4,0 мл 0,025 М трис-буфера (рН 8,0), що містив 2 мМ ЕДТА, 1 мМ 2-меркаптоетанолу, 0,1 мМ фенілметилсульфонілфториду та сосвий інгібітор трипсину (10 мкг/мл). Гомогенат центрифугували при 30 000 г протягом 60 хв. Супернатант (S_1) містив розчинні білки. Осад ресуспендували в 0,5 мл тієї ж буферної системи, яка додатково містила 4 М сечовину. Супернатант, який отримували після другого центрифугування (S_2), містив нерозчинні білки проміжних філаментів. Уміст загального білка в екстрактах визначали методом Лоурі в модифікації Міллера (Miller, 1959). Визначення поліпептидного складу гліальних філаментів проводили за допомогою імуноблотингу з використанням поліклональної моноспецифічної антисироватки у розведенні 1 : 1 500, як описано раніше. Кількісний аналіз ГФКБ проводили за допомогою комп'ютерної обробки сканованих результатів імуноблотингу (LabWork 4.0). Рівень перекисного окислення ліпідів вимірювали з використанням тест-набору LPO-586 (Oxis, Int. Inc., USA).

Обробку одержаних даних проводили методами варіаційної статистики для малих вибірок. Відносний вміст ГФКБ виражали у вигляді середньої величини \pm стандартна похибка середньої ($\bar{x} \pm SE$), достовірну різницю між групами оцінювали із застосуванням t -критерію Стьюдента ($P < 0,05$) після перевірки гіпотез про нормальність розподілу.

Результати та їх обговорення

Уведення стрептозотоцину викликало яскраво виражену гіперглікемію порівняно з контрольною групою щурів. Ін'єкції α -ліпоєвої кислоти (100 мг/кг) протягом 45 діб спричинили значне зниження рівня глюкози порівняно з СТЗ-діабетичною групою щурів. Виявлений рівень перекисного окислення ліпідів був значно вищим у групі СТЗ-діабетичних тварин відносно контрольної групи (рис. 1), а вміст відновленого глутатіону був істотно зниженим у тканинах мозку тварин з індукованим діабетом відносно контролю (рис. 2). Однак уміст продуктів ПОЛ значно знижувався, а вміст відновленого глутатіону у гіпокампі та корі зростав під час курсових ін'єкцій α -ліпоєвої кислоти в групі α -ліпоєвої кислоти щодо групи СТЗ-діабетичних щурів. Усе це разом свідчить про виражений антиоксидантний ефект α -ліпоєвої кислоти за умов гіперглікемії, індукованої введенням СТЗ.

Рівень експресії ГФКБ був значно вищим у всіх досліджених відділах мозку у тварин із групи СТЗ щодо контрольної групи (рис. 3). Уміст деградованих поліпептидів ГФКБ був також істотно збільшеним у всіх відділах мозку щурів із діабетом. Разом із підвищенням загального вмісту ГФКБ виявлено також значне зростання вмісту поліпептидних фрагментів ГФКБ в усіх досліджених відділах мозку діабетичних щурів (рис. 4). На підставі отриманих результатів можна припустити, що СТЗ-індукований діабет викликає реактивний гліоз, оскільки обидва білки є маркерами активності глії.

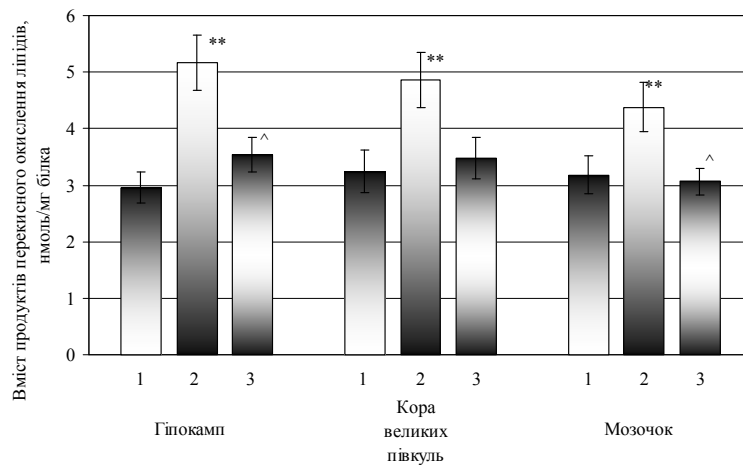


Рис. 1. Вміст кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів у відділах мозку щурів контрольної (1), СТЗ-діабетичної (2) та СТЗ-діабетичної + α-ЛК (3):
 ** – P < 0,01 порівняно з контрольною групою; ^ – P < 0,05 порівняно з СТЗ-діабетичною групою

Уведення α-ліпоєвої кислоти (100 мг/кг) протягом 45 днів сприяло статистично достовірному зниженню вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів, а також підвищенню вмісту відновленого глутатіону в гіпокампі та корі великих півкуль порівняно з СТЗ-діабетичною групою. У той же час, рівень експресії ГФКБ суттєво підвищений у всіх досліджених відділах мозку тварин СТЗ-діабетичної групи відносно контрольної. Повторні ін'єкції α-ліпоєвої кислоти викликали в групі α-ЛК істотне гальмування експресії гліального маркера ГФКБ.

Ін'єкції α-ліпоєвої кислоти викликали також суттєве зниження вмісту деградованих поліпептидних фрагментів ГФКБ. Значні зміни вмісту та поліпептидного складу ГФКБ свідчать про інтенсивні цитоскелетні перебудови та пригнічення астрогліозу введенням α-ліпоєвої кислоти. Визначено значущі кореляції між вмістом ГФКБ і продуктів перекисного окиснення ліпідів у гіпокампі ($r = 0,675$, $P < 0,01$) і корі великих півкуль ($r = 0,603$, $P < 0,05$) мозку діабетичних щурів.

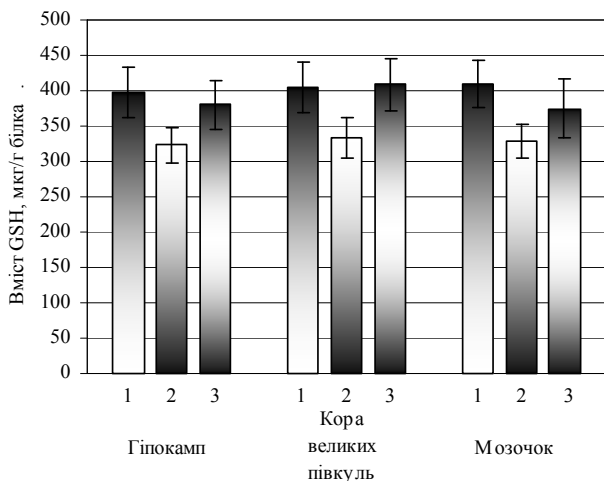


Рис. 2. Вміст глутатіону відновленого у відділах мозку щурів контрольної (1), СТЗ-діабетичної (2) та СТЗ-діабетичної + α-ЛК (3)

Дегенерація та загибель нейронів при діабеті можуть бути пов'язані зі збільшеним утворенням вільних радикалів через порушення функціонування мітохондрій і антиоксидантної системи (Graham, 1999). Виявлено

збільшення загибелі нейронів у разі оксидативного стресу, що може бути однією з причин діабетичної нейропатії. Глутатіон є антиоксидантом у всіх типах тваринних клітин. Він реагує з вільними радикалами та може захистити клітини від ушкоджень, індукованих синглетним киснем, гідроксид- і супероксид-радикалами. Відповідно попереднім дослідженням у нашій статті показано зниження вмісту глюкози за умови введення щурам α-ліпоєвої кислоти на тлі СТЗ-індукованого діабету.

Цілком можливо, що до такого зниження вмісту глюкози залучається механізм, за допомогою якого введення кислоти спричинювало посилення стимульованого інсуліном метаболізму глюкози у м'язових клітинах. Припускається, що гіперглікемія індукує реактивний гліоз із залученням залежних від вільних радикалів метаболічних шляхів, які активують гліальні клітини.

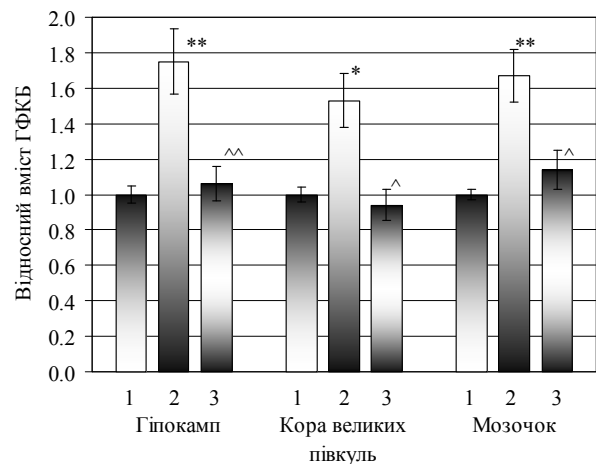


Рис. 3. Відносний вміст фракції загального ГФКБ у мозку щурів: 1 – контрольна група, 2 – СТЗ-діабетична група, 3 – СТЗ-діабетична група щурів, які отримували ін'єкції α-ЛК (100 мг/кг) (n = 14–16); * – P < 0,05, ** – P < 0,01 – достовірність різниці відносно контрольної групи; ^ – P < 0,05; ^^ – P < 0,01 – відносно групи СТЗ-діабетичних щурів

наявність позитивної кореляції між експресією гліальних маркерів і вмістом продуктів ПОЛ у гіпокампі та корі великих півкуль мозку діабетичних щурів підтверджує цю гіпотезу. Астроцити центральної нервової

системи активуються до проліферації та диференціації у разі механічних і фізичних пошкоджень, захворювань різної природи та хімічного інсульту (Pekny et al., 2004). Можливо припустити позитивний вплив астрогліозу на

виживаність нейронів. Однак відомо, що активовані гліальні клітини секретують також цитокіни, компоненти системи комплементу та вільні радикали, які спричинюють ушкодження нервових клітин.

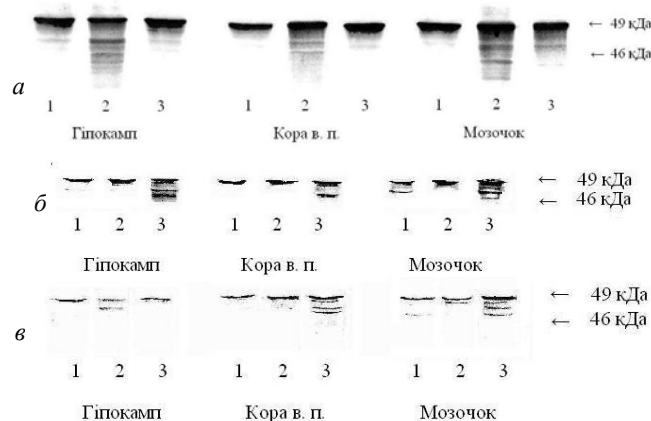


Рис. 4. Імуноблотинг ГФКБ із мозку щурів: *а* – імуноблотинг цитоскелетних фракцій ГФКБ, *б* – імуноблотинг тритонових фракцій ГФКБ, *в* – імуноблотинг розчинних цитоскелетних фракцій ГФКБ; 1 – контрольна група, 2 – СТЗ-діабетична група, 3 – СТЗ-діабетична група щурів, які отримували ін'єкції α -ліпоєвої кислоти (100 мг/кг)

Виявлене зниження вмісту продуктів ПОЛ у відділах мозку діабетичних щурів в умовах уведення α -ліпоєвої кислоти дозволяє припустити, по-перше, що введення α -ліпоєвої кислоти запобігає порушенням обміну ліпідів при діабеті і, по-друге, принаймні часткова протективна дія α -ліпоєвої кислоти при гіперглікемічному нейрональному ушкодженні реалізується за рахунок перехоплення вільних радикалів і антиокисних властивостей. Ці припущення збігаються з раніше описаним захисним ефектом кислоти за токсичного нейронального ушкодження за рахунок перехоплення вільних радикалів (Song et al., 2005). Уведення α -ліпоєвої кислоти викликало збільшення вмісту відновленого глутатіону у відділах мозку, що дозволяє припустити захисний ефект від окисного стресу за рахунок антиокисних властивостей кислоти та збільшення, у свою чергу, захисного потенціалу тканин мозку проти індукованого стрептозоцином оксидативного стресу (Baydas et al., 2004).

α -Ліпоєва кислота може виявитися ефективною при запобіганні та терапії оксидативного стресу в ряді модельних або клінічних ситуацій. Такі антиоксиданти як α -ліпоєва кислота, глутатіон і вітаміни А, Е, С беруть участь у детоксифікації перекису водню, гідроксид- і пероксидрадикалів, реактивних сполук азоту. Крім того, вони активують антиоксидативні ферменти супероксиддисмутазу та глутатіонпероксидазу. Оксидативний стрес при діабеті спричинює ушкодження нуклеїнових кислот, білків і ліпідів, що супроводжується клітинною дисфункцією і некрозом, а також викликає функціональну та структурну дегенерацію центральної нервової системи (Bruckner, 2002). Таким чином, антиоксиданти можуть знаходити застосування у профілактиці серцево-судинних і мозкових ускладнень діабету, знижуючи нагромадження активних форм кисню.

Захисний ефект α -ліпоєвої кислоти також виражався у зменшенні реактивності глії. Отримані дані уперше демонструють зниження експресії гліальних і нейронального маркерів у різних відділах мозку діабетичних щурів в умовах уведення α -ліпоєвої кислоти. Унаслідок

позитивної асоціації між рівнем маркерів і вагою враження це зниження можна розглядати як позитивну тенденцію до відновлення порушеного при діабеті функціонування нервової системи. Gonzalez-Perez et al. (2002) знайшли зниження реактивного гліюзу в моделі тромбоемболічного інсульту у щурів при введенні α -ліпоєвої кислоти та вітаміну Е внаслідок їх антиоксидантної активності. Можливий одночасний внесок декількох ушкоджувальних агентів у реакцію астроцитів при діабеті, одним із них служить атака центральної нервової системи вільними радикалами (Yang et al., 2010). У даній праці показано пряму відповідь астроцитів на оксидативний стрес, яка супроводжується підвищенням експресії гліальних маркерів при гіперглікемії та її зниженням у разі уведення антиоксиданта (α -ліпоєвої кислоти). Крім того, зниження експресії нейрон-специфічної енолази у разі уведення кислоти може вказувати на її захисний ефект за ушкодження нейронів в умовах гіперглікемії. Крім антиоксидантних властивостей α -ліпоєва кислота може бути нейропротектором *in vivo* за рахунок пригнічення надмірної реактивності глії, що ускладнює нейропатію при діабеті. Уведення кислоти може викликати подвійний протекторний ефект при діабетичній нейропатії за рахунок зниження як оксидативного стресу, так і реактивності глії.

Останнім часом активно досліджуються властивості α -ліпоєвої кислоти як нетоксичного природного антиоксиданта (Bonfont-Rousselot, 2004). Тканини центральної нервової системи та периферичних нервів здатні швидко поглинати α -ліпоєву кислоту. Продемонстровано антиоксидантний ефект цієї кислоти під час застосування таких прооксидантів як гідроксид-радикал, гіпохлорна кислота, перекис водню, синглетний кисень, закис азоту та пероксинітрил. Недавно запропоновано використання α -ліпоєвої кислоти як терапевтичного агента – антиоксиданта для лікування низки нейродегенеративних захворювань (Poony et al., 2005).

Дегенерація та загибель нейронів при діабеті можуть бути пов'язані з активацією утворення вільних радикалів

через порушення функціонування мітохондрій і антиоксидантної системи (Gandhi, 2010).

Представлені результати свідчать про те, що активність гліальних клітин має вирішальне значення для репарації нейрональних ушкоджень різної природи. У той самий час надмірно інтенсивний розвиток астрогліозу може бути не тільки корисним, а і в окремих випадках перешкоджати репарації через формування гліально-мезодермального рубця. Існують дані, що гіпертрофовані астроцити, які утворюють гліальний рубець у відповідь на хімічний інсульт, можуть гальмувати проростання нейритів. Таким чином, антиоксиданти виявляють нейропротекторну дію не лише через безпосереднє гальмування окисного стресу, а й завдяки зниженню надмірно інтенсивної астрогліальної відповіді.

Висновки

При експериментальному стрепозотоцин-індукованому діабеті відбувається суттєве підвищення вмісту ТБК-реактивних продуктів у відділах мозку щурів порівняно з контрольною групою та зниження рівня глутатіону. Визначено збільшення вмісту астроцитарного цитоскелетного маркера ГФКБ та поліпептидного складу у мозку щурів експериментальної групи, які корелюють із вмістом ТБК-реактивних продуктів. Уведення α -ліпоєвої кислоти (100 мг/кг) протягом 45 діб сприяло статистично достовірному зниженню вмісту продуктів переокисного окиснення ліпідів, а також підвищенню вмісту відновленого глутатіону в гіпокампі та корі великих півкуль порівняно з СТЗ-діабетичною групою та суттєвому зниженню вмісту деградованих поліпептидних фрагментів ГФКБ. Значні зміни вмісту та поліпептидного складу ГФКБ свідчать про інтенсивні цитоскелетні перебудови та пригнічення астрогліозу уведенням α -ліпоєвої кислоти.

Бібліографічні посилання

Baydas, G., Donder, E., Kiliboz, M., Sonkaya, E., Tuzcu, M., Yasar, A., Nedzvetskii, V.S., 2004. Neuroprotection by α -lipoic acid in streptozotocin-induced diabetes. *Biochemistry (Moscow)* 69(9) 1233–1238.

Bernal, J., Nunez, J., 1995. Thyroid hormones and brain development. *Eur. J. Endocrinol.* 133(4), 390–398.

Bonnefont-Rousselot, D., 2004. The role of antioxidant micro-nutrients in the prevention of diabetic complications. *Treat Endocrinol.* 3(1), 41–52.

Bruckner, I., Bustan, C., Adamescu, E., Dobjanschi, C., 2002. Diabetic neuropathy-choices of treatment. *Rom. J. Intern. Med.* 40(1–4), 53–60.

Eng, L.F., 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). *Neurochem. Res.* 25(9–10), 1439–1451.

Gandhi, G.K., Ball, K.K., Cruz, N.F., Diemel, G.A., 2010. Hyperglycaemia and diabetes impair gap junctional communication among astrocytes. *ASN Neuro* 15(2), e00030.

Gonzalez-Perez, O., Gonzalez-Castaneda, R.E., Huerta, M., Luquin, S., Gomez-Pinedo, U., Sanchez-Almaraz, E., Navarro-Ruiz, A., Garcia-Estrada, J., 2002. Beneficial effects of alpha-lipoic acid plus vitamin E on neurological deficit, reactive gliosis and neuronal remodeling in the penumbra of the ischemic rat brain. *Neurosci. Lett.* 321(1–2), 100–104.

Graham, D.G., 1999. Neurotoxicants and the cytoskeleton. *Curr. Opin. Neurol.* 12(6), 733–737.

Lepekhn, E.A., Eliasson, C., Berthold, C.H., Berezin, V., Bock, E., Pekny, M., 2001. Intermediate filaments regulate astrocyte motility. *J. Neurochem.* 79(3), 617–625.

O'Callaghan, J.P., Jensen, K.F., Miller, D.B., 1995. Quantitative aspects of drug and toxicant-induced astrogliosis. *Neurochem. Int.* 26(2), 115–124.

Panickar, K.S., Jayakumar, A.R., Rama Rao, K.V., 2007. Down-regulation of the 18-kDa translocator protein: Effects on the ammonia-induced mitochondrial permeability transition and cell swelling in cultured astrocytes. *Glia* 55(16), 1720–1727.

Pekny, M., Pekna, M., 2004. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J. Pathol.* 204(4), 428–437.

Poon, H.F., Farr, S.A., Thongboonkerd, V., Lynn, B.C., Banks, W.A., Morley, J.E., Klein, J.B., Butterfield, D.A., 2005. Proteomic analysis of specific brain proteins in aged SAMP8 mice treated with alpha-lipoic acid: Implications for aging and age-related neurodegenerative disorders. *Neurochem. Int.* 46(2), 159–168.

Rose, C., 2006. Effect of ammonia on astrocytic glutamate uptake/release mechanisms. *J. Neurochem.* 97, 11–15.

Song, K.H., Lee, W.J., Koh, J.M., Kim, H.S., Youn, J.Y., Park, H.S., Koh, E.H., Kim, M.S., Youn, J.H., Lee, K.U., Park, J.Y., 2005. alpha-Lipoic acid prevents diabetes mellitus in diabetes-prone obese rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326(1), 197–202.

Yang, Z., Li, K., Yan, X., Dong, F., Zhao, C., 2010. Amelioration of diabetic retinopathy by engrafted human adipose-derived mesenchymal stem cells in streptozotocin diabetic rats. *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2, 345–349.

Надійшла до редколегії 12.07.2014