

## **ВЛИЯНИЕ МИФЕПРИСТОНА НА ГЛЮКОКОРТИКОИДНУЮ ИНДУКЦИЮ АКТИВНОСТИ АМИНОТРАНСФЕРАЗ В ПЕЧЕНИ КРЫС СО СТРЕПТОЗОТОЦИНОВЫМ ДИАБЕТОМ**

**Пальчикова Н.А.<sup>1</sup>, Пасечная К.В.<sup>1</sup>, Селятицкая В.Г.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Новосибирск, e-mail: labend@mail.ru*

**Понимание механизмов повышения активности ферментов, участвующих в переводе аминокислот в реакции глюконеогенеза при сахарном диабете, необходимо для разработки эффективной стратегии предотвращения утяжеления гипергликемии в динамике заболевания. Целью исследования было изучить динамические характеристики индукции дексаметазоном активности аминотрансфераз в печени крыс со стрептозотоциновым диабетом после многократного введения мифепристона. У здоровых животных длительное введение мифепристона снижало в печени в 2 раза выраженность глюкокортикоидной индукции активности тирозинаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы. У крыс со стрептозотоциновым диабетом мифепристон не влиял на подъем активности тирозинаминотрансферазы, но способствовал снижению активности аланинаминотрансферазы через 4 часа после введения дексаметазона. Активность аспаратаминотрансферазы в динамике глюкокортикоидной индукции менялась в меньшей степени и соответствовала изменениям активности аланинаминотрансферазы. Сравнительный анализ изменения активности тирозинаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в динамике после введения дексаметазона позволил предположить, что у здоровых животных мифепристон блокировал преимущественно глюкокортикоидные рецепторы в печени, а у животных со стрептозотоциновым диабетом – в мышечной и других тканях и органах, являющихся поставщиками аланина и других глюконеогенных аминокислот для глюконеогенеза в печени в условиях диабетической гипергликемии.**

**Ключевые слова:** крысы, мифепристон, стрептозотоциновый диабет, дексаметазон, печень, активность аминотрансфераз

## **EFFECT OF MIFEPRISTON ON THE GLUCOCORTICOID INDUCTION OF AMINOTRANSFERASE ACTIVITY IN STREPTOZOTOCIN DIABETES RAT LIVER**

**Palchikova N.A.<sup>1</sup>, Pasechnaya K.V.<sup>1</sup>, Selyatitskaya V.G.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*FSBSI «Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine», Novosibirsk, e-mail: labend@mail.ru*

**Insight the mechanisms of increasing the activity of enzymes involved in the translation of amino acids in the reaction of gluconeogenesis in diabetes is necessary to develop an effective strategy to prevent the weighting of hyperglycemia in the dynamics of the disease. The aim of the study was to study the dynamic characteristics of the dexamethasone induction of aminotransferases activity in the liver of rats with streptozotocin diabetes after repeated administration of mifepristone. In healthy animals, long-term administration of mifepristone reduced in the liver twice the severity glucocorticoid induction of activity of tyrosine aminotransferase and alanine aminotransferase. In rats with streptozotocin diabetes, mifepristone did not affect the rise of tyrosine aminotransferase activity, but contributed to a decrease in the activity of alanine aminotransferase 4 hours after the administration of dexamethasone. The activity of aspartate aminotransferase in the dynamics of glucocorticoid induction varied to a lesser extent and corresponded to changes in the activity of alanine aminotransferase. It was suggested based on comparative analysis of changes in the activity of tyrosine aminotransferase and alanine aminotransferase in dynamics after the introduction of dexamethasone, that mifepristone blocks glucocorticoid receptors mainly in the healthy animals liver, and in animals with streptozotocin diabetes – in muscle, other tissues and organs that are suppliers of alanine and other glucogenic amino acids for gluconeogenesis in the liver at diabetic hyperglycemia.**

**Keywords:** rat, mifepristone, streptozotocin diabetes, dexamethasone, liver, aminotransferase activity

Глюкокортикоидные гормоны являются важными регуляторами активности метаболических путей в организме, осуществляющими свои эффекты путем индукции активности ферментов, катализирующих реакции превращения в них субстратов. Классическим примером является индукция глюкокортикоидными гормонами ключевых

ферментов глюконеогенеза и ферментов, катализирующих реакции переаминирования аминокислот с последующим их включением в глюконеогенез [1].

Стойкий гиперкортицизм может приводить к развитию патологических состояний, например синдрома Кушинга [2], вызывать иммунодефицитные заболевания, остеопороз, стероидный диабет и т.д. [3]. Усиление синтеза и секреции глюкокортикоидных гормонов при сахарном диабете может утяжелять гипергликемию за счет активации реакций глюконеогенеза, что показано как в клинических, так и в экспериментальных исследованиях [4].

Одним из препаратов, используемых для нивелирования эффектов гиперкортицизма при болезни Кушинга, является мифепристон (МФ), который обладает высоким сродством к рецепторам прогестерона и глюкокортикоидных гормонов и выступает как конкурентный антагонист этих гормонов, снижая их эффекты на уровне тканей-мишеней [2]. Однако имеются сведения, что само введение МФ по механизмам обратной связи также сопровождается подъемом уровня глюкокортикоидных гормонов в крови [5]. Это ставит вопрос об эффективности МФ по предотвращению эффектов гиперкортицизма в условиях сахарного диабета и механизмах его действия.

Ранее нами было показано, что у животных со стрептозотоциновым диабетом (СтД) на фоне введения МФ в печени повышалась активность аминотрансфераз, причем наиболее выраженный эффект проявился в отношении аланинаминотрансферазы (АлАТ). Активность только АлАТ повысилась у здоровых крыс, а также увеличилась в большей степени, чем активность тирозинаминотрансферазы (ТАТ) и аспаратаминотрансферазы (АсАТ), у крыс с СтД после введения МФ [6]. Было высказано предположение, что глюкокортикоидные гормоны, концентрация которых в крови крыс с СтД в условиях введения МФ повышалась дополнительно, могут преодолевать блокаду рецепторов и осуществлять свои регуляторные функции в гепатоцитах, в частности повышать активность аминотрансфераз. В условиях диабета при недостатке в циркуляции инсулина избыток глюкокортикоидных гормонов способствует увеличению протеолиза в мышцах и повышению содержания аминокислот в печени, усиливающих активность специфических аминотрансфераз путем субстратной активации [7]. По своим временным характеристикам субстратная активация ферментов, как и другие негеномные эффекты глюкокортикоидов, быстрее гормональной, поскольку количество молекул фермента не увеличивается, в отличие от гормональной индукции, связанной с усилением под влиянием гормон-рецепторного комплекса синтеза мРНК и, соответственно, молекул фермента *de novo* [8]. Понимание механизмов повышения активности ферментов, участвующих в переводе аминокислот в реакции глюконеогенеза при сахарном диабете, необходимо для разработки эффективной стратегии предотвращения

утяжеления гипергликемии в динамике заболевания.

**Цель исследования:** изучить динамические характеристики индукции дексаметазоном активности аминотрансфераз в печени крыс с СтД после многократного введения мифепристона.

**Материал и методы исследования.** Работа проведена на половозрелых крысах-самцах Вистар с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г.). Животных (n=48) содержали в одиночных клетках на стандартном рационе вивария со свободным доступом к воде.

Были сформированы 4 группы животных: группа 1 – интактный контроль; группа 2 – крысам ежедневно в течение 10 дней *per os* вводили водную суспензию мифепристона, приготовленную из таблетированного фармацевтического препарата «Гинестрил 0,05» из расчета действующего вещества 20 мг/кг массы тела; группа 3 – крысам однократно интраперитонеально после 18-часового голодания вводили раствор стрептозотоцина (Sigma) в 0,04 М цитратном буфере (pH 4,2) в дозе 50 мг/кг массы тела; группа 4 – крысам начиная с 8-х суток после введения стрептозотоцина ежедневно в течение 10 дней перорально вводили суспензию мифепристона. На следующие сутки после 10-го введения МФ часть животных из каждой группы выводили из эксперимента путем декапитации; оставшимся крысам интраперитонеально вводили дексаметазон (ДМ) в дозе 5 мг/кг массы тела за 2 и 4 часа до выведения их из эксперимента.

Активность АЛАТ и АсАТ, а также содержание белка в ткани печени измеряли с использованием биохимических наборов «Fluitest GPT ALT», «Fluitest GOT AST», «Fluitest TP» (Analyticon Biotechnologies AG, Germany). Активность ферментов выражали в Ед/мг белка. Активность ТАТ определяли по методу Diamondstone [9] и выражали в нмоль пара-оксифенилпирувата/мг белка/мин.

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе Statistica 6.0 (StatSoft, США). Для парных сравнений использовали критерий Манна–Уитни, для множественных сравнений – критерий Крускала–Уоллеса. Данные представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – выборочное среднее,  $m$  – стандартная ошибка. Вероятность справедливости нулевой гипотезы принимали при 5%-ном уровне значимости.

**Результаты исследования и их обсуждение.** В таблице 1 приведены результаты исследования активности ТАТ в печени крыс всех групп экспериментальных животных. Активность ТАТ в настоящей работе использовали как классический пример глюкокортикоидной индукции активности фермента в печени, поскольку при изучении

активности именно ТАТ были выявлены основные дозозависимые и временные характеристики процесса гормональной индукции [10].

Таблица 1

Индукция дексаметазоном активности тирозинаминотрансферазы (нмоль/мг белка/мин) в печени крыс

Группа	Базальная активность	Через 2 часа после введения дексаметазона	Через 4 часа после введения дексаметазона	P
	1	2	3	
1. Контроль	0,72±0,03	0,71±0,11	2,67±0,36	1-3<0,05
2. Мифепристон	0,97±0,06	1,05±0,10	1,84±0,21	1-3<0,05
3. Стрептозотоциновый диабет	1,03±0,10	1,69±0,48	3,80±0,92	1-3<0,05
4. Стрептозотоциновый диабет + мифепристон	1,13±0,08	1,30±0,26	3,87±0,43	1-3<0,05
p	1-2,3,4<0,05		1-2,3,4<0,05	

Базальная активность ТАТ в печени животных после многократного введения МФ, при СтД и при введении МФ на фоне СтД (группы 2, 3, 4) увеличилась по сравнению с величиной у контрольных животных в 1,3–1,6 раза, что вероятнее всего обусловлено стойко повышенным содержанием в крови животных этих групп основного глюкокортикоидного гормона у грызунов кортикостерона [6]. У крыс контрольной группы активность ТАТ выросла в 3,7 раза только через 4 часа после введения ДМ. Эти результаты соответствуют сведениям из научной литературы, указывающим, что максимальная активность фермента наблюдается через 4–5 часов после введения гормона [10].

Аналогичная картина наблюдалась после введения ДМ крысам группы 2, однако в этом случае прирост активности был ниже – всего в 1,9 раза. Результаты указывают на эффективность введения МФ по используемым в работе схеме и количеству препарата в отношении блокады глюкокортикоидных рецепторов, которая снизила на 55% выраженность индукции ДМ активности ТАТ в печени крыс.

У крыс групп 3 и 4 с СтД уже через 2 часа после введения ДМ отмечено повышение активности ТАТ в 1,2–1,6 раза, а через 4 часа – в 3,4–3,7 раза относительно базальной активности и в 2,2–2,9 раза относительно величины активности ТАТ через 2 часа после введения ДМ. Повышение активности ТАТ через 2 часа после введения ДМ можно отнести в большей степени к проявлениям субстратной активации фермента, которая усилилась через 2 часа после введения ДМ только у животных с СтД. На этом фоне проявления гормональной индукции через 4 часа после введения ДМ были выражены в той же степени, что и у

здоровых крыс, но при этом у крыс группы 4 отсутствовал эффект многократного введения МФ (табл. 1). Полученные результаты поддерживают высказанное нами ранее предположение [6], что глюкокортикоидные гормоны, концентрация которых в крови крыс с СтД в условиях введения МФ повышалась дополнительно на фоне сниженного уровня инсулина в крови, могут преодолевать блокаду рецепторов и осуществлять свои регуляторные функции в гепатоцитах, в частности повышать активность ТАТ.

Активность АлАт для усиления гипергликемии при сахарном диабете имеет большее значение, чем активность ТАТ, поскольку именно АлАТ переводит аминокислоту аланин, которая образуется при катаболизме мышечных белков, через образование пирувата в реакции глюконеогенеза в печени [11].

Аналогично ТАТ (табл. 1) базальная активность АлАТ в печени была выше у животных групп 2, 3, 4 относительно контрольной группы, однако этот прирост был выражен в большей степени, чем для ТАТ, а именно в 1,7–2,3 раза (табл. 2). У крыс контрольной группы уже через 2 часа после введения ДМ активность фермента выросла в 2, а через 4 часа – в 3 раза относительно базальной активности АлАТ. У крыс группы 2 после введения ДМ активность АлАТ через 2 часа выросла в 1,3, а через 4 часа – только в 1,6 раза относительно базальной. Таким образом, введение МФ, так же как и в случае активности ТАТ, привело к снижению выраженности индукции ДМ активности АлАТ относительно базального уровня (на 47%).

Таблица 2

Индукция дексаметазоном активности аланинаминотрансферазы (Ед/г белка) в печени крыс

Группа	Базальная активность	Через 2 часа после введения дексаметазона	Через 4 часа после введения дексаметазона	Р
	1	2	3	
1. Контроль	110,6±9,3	228,2±68,6	330,0±49,3	1-2,3<0,05
2. Мифепристон	198,9±15,8	253,3±43,7	315,3±49,1	1-3<0,05
3. Стрептозотоциновый диабет	238,6±34,5	638,6±53,1	509,0±8,6	1-2,3<0,05 2-3<0,05
4. Стрептозотоциновый диабет + мифепристон	252,9±34,9	563,1±102,7	308,8±105,3	2-1,3<0,05
р	1-2,3,4<0,05		3-4<0,05	

У крыс групп 3 и 4 базальная активность АлАТ была повышена относительно контрольного уровня в 2,2–2,3 раза. Через 2 часа после введения ДМ активность АлАТ повысилась относительно базальной в 2,2–2,7 раза, а через 4 часа она снизилась в 1,3 раза у крыс с СтД и в 1,8 раза – у крыс с СтД, которым вводили МФ, относительно активности

фермента через 2 часа после введения ДМ.

Полученные результаты позволили предположить, что у крыс с СтД повышение активности АлАТ через 2 часа после введения ДМ обусловлено в большей степени повышением уровня субстрата, поскольку глюкокортикоидные гормоны через образование гормон-рецепторного комплекса и усиление процессов транскрипции в миоцитах в условиях недостатка инсулина активируют распад мышечных белков [12, 13] с образованием аланина, поступающего в печень. Источником аланина могут быть и другие органы и ткани [14]. В повышении активности АлАТ частично могут принимать участие ее индукция ДМ, а также негеномные эффекты глюкокортикоидных гормонов, быстро реализующиеся в условиях высоких «стрессорных» концентраций гормонов [8], соответствующих концентрации кортикостерона у крыс с СтД [6].

Снижение активности АлАТ через 4 часа у крыс групп 3 и 4 свидетельствует в пользу преимущественно субстратной активации фермента в печени крыс с СтД, при этом большее уменьшение активности АлАТ у крыс группы 4 после введения МФ указывает на блокаду глюкокортикоидных рецепторов этим препаратом не только в гепатоцитах, но и в миоцитах, что соответствует сведениям из литературных источников [13].

Базальная активность АсАТ в печени крыс была повышена относительно контрольных величин только у крыс с СтД (табл. 3). В ответ на введение ДМ через 2 часа активность АсАТ у здоровых крыс (группы 1 и 2) повысилась в 1,3–1,7 раза, оставаясь на том же уровне через 4 часа после введения ДМ. У крыс с СтД (группы 3 и 4) активность АсАТ также повысилась в 1,5–1,8 раза через 2 часа после введения ДМ, а через 4 часа – снизилась в 1,3–1,5 раза.

Таблица 3

Индукция дексаметазоном активности аспаратаминотрансферазы (Ед/г белка)  
в печени крыс

Группа	Базальная активность	Через 2 часа после введения дексаметазона	Через 4 часа после введения дексаметазона	Р
	1	2	3	
1. Контроль	558,3±39,9	744,5±88,5	786,3±85,4	1-3<0,05
2. Мифепристон	502,6±43,7	876,6±152,7	848,7±45,4	1-2,3<0,05
3. Стрептозотоциновый диабет	827,4±78,7	1275,2±62,9	1020,5±278,4	1-2<0,05
4. Стрептозотоциновый диабет + мифепристон	662,2±76,2	1220,9±119,5	837,7±149,4	1-2<0,05 2-3<0,05
р	1-3<0,05			

Полученные результаты свидетельствуют, что повышение активности АсАТ в печени здоровых крыс после введения ДМ можно отнести к субстратной активации фермента, в то же время изменения активности АсАТ в печени крыс экспериментальных групп 3 и 4 (см. табл. 3) соответствовали изменениям активности АлАТ, но были выражены в меньшей степени. Это может быть связано с локализацией АсАТ в митохондриях кардиомиоцитов и гепатоцитов, где она взаимодействует с ферментами цикла трикарбоновых кислот и участвует в регуляции активности энергетических процессов [15]. Следует отметить, что эффект от введения МФ прослеживался только у крыс с СтД, у которых активность фермента была ниже на уровне тенденции через 4 часа после введения ДМ по сравнению с животными группы 3.

**Заключение.** У здоровых животных длительное введение МФ снижало в печени в 2 раза выраженность глюкокортикоидной индукции активности аминотрансфераз – ТАТ и АлАТ. У крыс с СтД МФ не влиял на подъем активности ТАТ, но способствовал снижению активности АлАТ через 4 часа после введения ДМ. Сравнительный анализ изменения активности ТАТ и АлАТ в динамике после введения ДМ позволил предположить, что у здоровых животных МФ блокирует преимущественно глюкокортикоидные рецепторы в печени, а у животных с СтД – в мышечной и других тканях и органах, являющихся поставщиками аланина и других глюкогенных аминокислот для глюконеогенеза в печени в условиях диабетической гипергликемии.

### Список литературы

1. Granner D.K., Wang J.C., Yamamoto K.R. Regulatory Actions of Glucocorticoid Hormones: From Organisms to Mechanisms. *Glucocorticoid Signaling. Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2015. Vol.872. P.3-31. DOI: 10.1007/978-1-4939-2895-8\_1.
2. Katznelson L., Loriaux D.L., Feldman D., Braunstein G.D., Schteingart D.E., Gross C. Global clinical response in Cushing's syndrome patients treated with mifepristone. *Clin. Endocrinol*. 2014. Vol.80. №4. P.562-569. DOI: 10.1111/cen.12332.
3. Vandewalle J., Luybaert A., De Bosscher K., Libert C. Therapeutic mechanisms of glucocorticoids. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2018. Vol.29. №1. P.42-54. DOI: 10.1016/j.tem.2017.10.010.
4. Pasiaka A.M., Rafacho A. Impact of glucocorticoid excess on glucose tolerance: clinical and preclinical evidence. *Metabolites*. 2016. Vol.6. №24. P.1-21. DOI: 10.3390/metabo6030024.
5. Pal'chikova N.A., Kuznetsova N.V., Selyatitskaya V.G., Charkasova O.P., Kuz'mina O.I. Effects of intraperitoneal administration of mifepristone on glucocorticoid status of experimental

animals. Bull. Exp. Biol. Medicine. 2016. Vol.161. №2. P.257-260. DOI: 10.1007/s10517-016-3390-6.

6. Palchikova N.A., Selyatitskaya V.G., Kuzminova O.I., Pasechnaya K.V. Effects of mifepristone on aminotransferase activities in the liver in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. Bull. Exp. Biol. Med. 2018. Vol.165. №4. P.474-477. DOI: 10.1007/s10517-018-4197-4.

7. Opata A.A., Cheesman K.C., Geer E.B. Glucocorticoid regulation of body composition and metabolism. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Health and Disease. Springer, Cham. 2017. P.3-26.

8. Jiang C-L., Liu L., Tasker J.G. Why do we need nongenomic glucocorticoid mechanisms? Frontiers in Neuroendocrinology. 2014. Vol.35. P.72-75. DOI: 10.1016/j.yfrne.2013.09.005.

9. Quines C.B., Rosa S.G., Chagas P.M., da Rocha J.T., Dobrachinski F., Carvalho N.R., Soares F.A., da Luz S.C., Nogueira C.W. Homeostatic effect of p-chloro-diphenyl diselenide on glucose metabolism and mitochondrial function alterations induced by monosodium glutamate administration to rats. Amino Acids. 2016. Vol.48. №1. P.137-148. DOI: 10.1007/s00726-015-2073-3.

10. Мертвцов Н.П. Регуляция экспрессии генов стероидными гормонами. Новосибирск: Наука, Сибирское отделение, 1990. 262 с.

11. Лысиков Ю.А. Аминокислоты в питании человека // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2012. № 2. С. 88-105.

12. Shimizu N., Yoshikawa N., Ito N., Maruyama T., Suzuki Y., Takeda S-i., Nakae J., Tagata Y., Nishitani S., Takehana K., Sano M., Fukuda K., Suematsu M., Morimoto C., Tanaka H. Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle // Cell Metabolism. 2011. Vol.13. №2. P.170-182. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.01.001.

13. Patel R., Williams-Dautovich J., Cummins C.L. Minireview: new molecular mediators of glucocorticoid receptor activity in metabolic tissues. Mol. Endocrinol. 2014. Vol.28. №7. P.999-1011. DOI: 10.1210/me.2014-1062.

14. Consoli A., Nurjhan N., Reilly J.J., Bier D.M., Gerich J.E. Mechanism of increased gluconeogenesis in noninsulin-dependent diabetes mellitus. J. Clin. Invest. 1990. Vol.86. P.2038-2045.

15. Фокина Е.Г., Рослый И.М. Энзимологическая часть биохимического паспорта человека // Медицинский алфавит. Эпидемиология и гигиена. 2013. №4. С.34-36.