

Шахристова Евгения Викторовна, заведующий учебной лабораторией оптической спектроскопии кафедры биохимии и молекулярной биологии Сибирского государственного медицинского университета, г. Томск.

E-mail: shaxristova@yandex.ru
Область научных интересов: молекулярные механизмы патогенеза сахарного диабета.

Иванов Владимир Владимирович, канд. биол. наук, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии Сибирского государственного медицинского университета, г. Томск.

E-mail: ivanovvv.1953@qip.ru
Область научных интересов: сахарный диабет, окислительный стресс, рецепция инсулина.

Степовая Елена Алексеевна, д-р мед. наук, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России, г. Томск.

E-mail: muir@mail.ru
Область научных интересов: патохимия клетки, окислительная модификация макромолекул.

Новицкий Вячеслав Викторович, д-р мед. наук, академик РАМН, профессор, ректор Сибирского государственного медицинского университета, г. Томск, Заслуженный деятель науки РФ, Заслуженный работник культуры РФ, заведующий кафедрой патофизиологии.

E-mail: office@ssmu.ru
Область научных интересов: патофизиология клеток крови.

УДК [577.152.1.084:547.854.6.044]:[577.125.2.:54-128.2.024]

ВЛИЯНИЕ СУПЕРОКСИДНОГО АНИОН-РАДИКАЛА И ГЛУТАТИОНА НА ЛИПОЛИЗ В АДИПОЦИТАХ КРЫС ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ, ИНДУЦИРОВАННОМ АЛЛОКСАНОМ

Е.В. Шахристова, В.В. Иванов, Е.А. Степовая,
В.В. Новицкий

Сибирский государственный медицинский университет,
г. Томск
E-mail: shaxristova@yandex.ru

Установлено, что в адипоцитах крыс при действии аллоксана развивается окислительный стресс, сопровождающийся увеличением спонтанного липолиза и ингибированием стимулированного агонистом β_2 -адренорецепторов изопротеренолом липолиза. На основании полученных данных сделан вывод о влиянии активных форм кислорода, в частности супероксидного анион-радикала, и системы глутатиона на молекулярные механизмы изменения интенсивности липолиза в адипоцитах крыс в условиях окислительного стресса, индуцированного аллоксаном.

Ключевые слова:

Адипоциты, аллоксан, липолиз, глутатион, супероксидный анион-радикал, марганец-тетра (N-метил-4-пиридил) порфирин, N-этилмалеимид.

Введение

Согласно современным представлениям в механизмах возникновения сахарного диабета (СД) 1 и 2 типов и развития их осложнений важную роль играет окислительный стресс [1–6]. Патогенетической основой СД 1 типа, или инсулинзависимого диабета, служит аутоиммунный процесс, приводящий к деструкции В-клеток островков Лангерганса и недостаточной секреции инсулина [7, 8]. Цитокины (интерлейкин 1β , фактор некроза опухоли α , интерферон γ и др.), продуцируемые макрофагами и лимфоцитами в ходе аутоиммунного процесса, способствуют генерации в В-клетках островков Лангерганса активных форм кислорода (АФК) и активации свободнорадикального окисления, продукты которого участвуют в цитокининопосредованной деструкции В-клеток [9, 10].

Наряду с этим окислительный стресс вносит существенный вклад в развитие осложнений СД, в первую очередь, инсулинорезистентности [11, 12]. Согласно современным представлениям жировая ткань играет важную роль в механизмах развития инсулинорезистентности при СД [13, 14]. Гипергликемия и высокий уровень свободных

жирных кислот (СЖК) в плазме крови при СД также способствуют гиперпродукции супероксидного анион-радикала в дыхательной цепи митохондрий, что приводит к окислительной мо-

дификации макромолекул в клетке [1, 15–17]. Важную роль в защите клеток от окислительного стресса играет глутатион, который по современным представлениям не только принимает участие в антиоксидантной защите клеток, но и в регуляции экспрессии генов, внутриклеточной сигнализации и регуляции активности ферментов [18].

Известно, что диабетогенное действие аллоксана опосредовано продукцией АФК преимущественно в В-клетках островков Лангерганса, обладающих низкой активностью ферментов антиоксидантной защиты [19]. При этом аллоксан, восстанавливаясь в диалуровую кислоту, способствует продукции АФК, в частности супероксидного и гидроксильного анион-радикалов ($O_2^{\cdot-}$ и $OH^{\cdot-}$, соответственно) (рис. 1) [20–22]. Это позволяет использовать аллоксан в качестве прооксиданта для моделирования окислительного стресса в изолированных клетках.

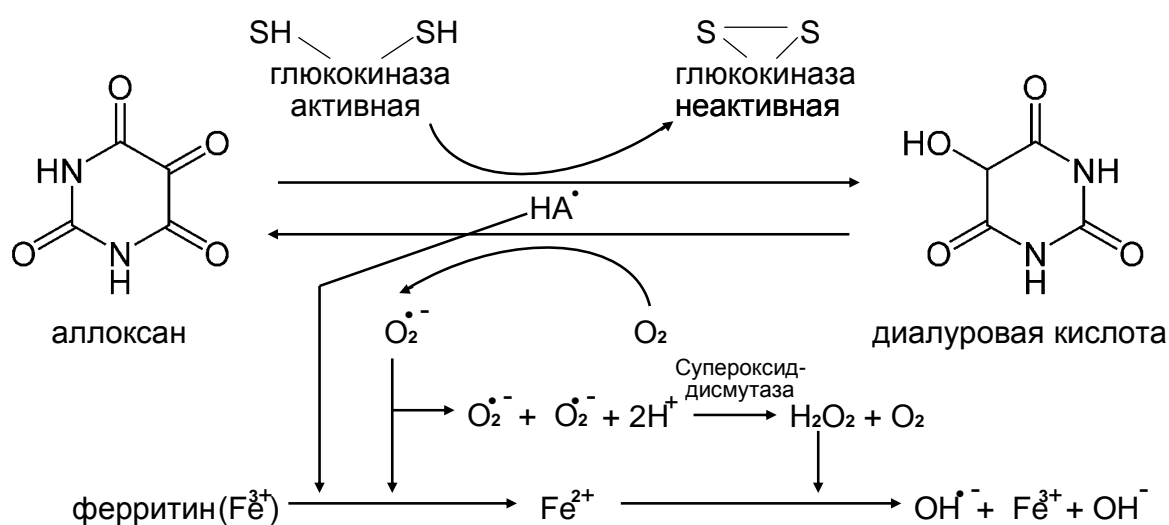


Рис. 1. Механизм продукции активных форм кислорода В-клетками поджелудочной железы крыс под действием аллоксана [20]

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния супероксидного анион-радикала и глутатиона на спонтанный и стимулированный липолиз в изолированных адипоцитах крыс при окислительном стрессе, индуцированном аллоксаном.

Материал и методы исследования

В исследование были включены 20 белых беспородных крыс-самцов весом 310 ± 50 г, полученных из ОАО Питомник «Рассвет» г. Томска. Животных содержали в стандартных условиях вивария на обычном рационе кормления при свободном доступе к воде и пище. Исследования на крысах проводились согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1987 г.) и Федеральному Закону «О защите животных от жестокого обращения» от 01.09.1997 г., а также с соблюдением конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, принятой Европейским союзом в 1986 г., и директивы 86/609 ЕЭС, основанной на тексте соглашения «Dr. Robert Hubrecht, Current EU Legislation Controlling Animal Experiments».

Крыс подвергали CO_2 -асфиксии, получали эпидидимальную жировую ткань, из которой выделяли адипоциты по методу M. Rodbell [23] с использованием коллагеназы («Sigma Aldrich», США). Концентрацию адипоцитов в суспензии стандартизировали до 1×10^6 клеток в 1 мл с помощью разведения буфером, содержащим 10 мМ HEPES, раствор Кребса-Рингера, 2 % бычий сывороточный альбумин, 5 мМ глюкозы. Жизнеспособность выделенных клеток оценивали с трипановым синим («Serva», США). Доля живых клеток составляла не менее 95 %.

Окислительный стресс в изолированных адипоцитах индуцировали добавлением 5,0 мМ аллоксана («Sigma», США) [20]. Клетки инкубировали 3 ч при 37 °С в CO₂-инкубаторе («Sanyo», Япония). Интенсивность спонтанного липолиза, а также стимулированного агонистом β₂-адренорецепторов – изопротеренолом (1 мкМ, «Sigma», США) [24] и аналогом цАМФ – N(6)-2'-дibuтирил-цАМФ (Db-cAMP) (0,5 мМ, «Sigma», США) [25] липолиза оценивали по содержанию глицерола в среде инкубации адипоцитов, определяемого ферментативным методом [26].

Для выявления влияния продуцируемого аллоксаном O₂^{•-} на липолиз в адипоцитах клетки инкубировали с ловушкой супероксидного анион-радикала – марганец-тетра (N-метил-4-пиридил) порфирином (Mn-TMPyP) («Sigma», США) в конечной концентрации 100 мкМ [27]. Для оценки участия глутатиона в модуляции липолиза в адипоцитах в условиях окислительного стресса индуцированного аллоксаном клетки инкубировали с блокатором SH-групп – N-этилмалеимидом (NEM) («Sigma», США) в конечных концентрациях 0,2 и 0,8 мМ [28]. После инкубации адипоцитов с NEM в клетках определяли содержание восстановленной и окисленной форм глутатиона циклическим методом M. E. Anderson [29], а также концентрацию белковосвязанного глутатиона, после осаждения белков 5 % сульфосалициловой кислотой. Оценивали интенсивность спонтанного и стимулированного изопротеренолом липолиза по выходу глицерола в среду инкубации адипоцитов [26].

При оценке полученных данных использовали методы статистического описания и проверки статистических гипотез с использованием программы SPSS 11.0 for Windows. Проверка на соответствие выборок нормальному закону распределения проводилась критерием Шапиро–Вилка. В связи с отсутствием согласия данных с нормальным распределением на уровне значимости p<0,05 вычисляли средневыборочные характеристики: медиана (Me), первый и третий квартили (Q₁–Q₃). Достоверность различий независимых выборок оценивали с помощью непараметрического критерия для малых групп Краскала–Уолиса – для пяти независимых групп исследования. Различия считались достоверными при достигнутом уровне значимости p<0,05 «*». Межгрупповой анализ проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни.

Результаты и их обсуждение

В результате экспериментов было установлено, что инкубация адипоцитов с аллоксаном (5 мМ) приводит к существенной активации спонтанного липолиза (рис. 2). Для доказательства участия активных метаболитов кислорода в модулировании липолиза аллоксаном адипоциты предварительно инкубировали с проникающим в клетки миметиком супероксид-дисмутазы MnTMPyP (100 мкМ). В результате экспериментов было установлено, что инкубация адипоцитов с 100 мкМ MnTMPyP не влияла существенно на спонтанный липолиз (концентрация глицерола в среде инкубации составляла 0,35 (0,29...0,36) мкмоль/10⁶ клеток, а в контроле 0,32 (0,26...0,32) мкмоль/10⁶ клеток) (рис. 2). В тоже время добавление к адипоцитам ловушки O₂^{•-} в 1,4 раза снижало повышенный под влиянием аллоксана выход глицерола в инкубационную среду, что свидетельствует о важной роли АФК в стимулирующем эффекте диабета на спонтанный липолиз в адипоцитах (рис. 2). Можно предполагать, что генерация O₂^{•-} и высвобождение ионов железа из ферритина под действием аллоксана [20] приводит к образованию OH[•] в реакции Фентона, активации ПОЛ и окислительной модификации фосфолипидов, покрывающих жировую каплю в адипоцитах. Это способствует большей доступности ТАГ действию липазы.

Аллоксан оказывал противоположный эффект на стимулированный изопротеренолом (1 мкМ) липолиз. Инкубация адипоцитов с аллоксаном (5 мМ) приводила к ингибированию на 39 % стимулированного изопротеренолом (1 мкМ) липолиза, и выход глицерола в среду инкубации составил 0,73 (0,72...0,89) мкмоль/10⁶ клеток (рис. 2). Полученный эффект ингибирования стимулированного β-агонистом липолиза в изолированных адипоцитах при добавлении аллоксана *in vitro* согласуется с полученными нами данными о снижении интенсивности стимулированного липолиза в адипоцитах крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом [30].

Для изучения роли O₂^{•-} в ингибировании аллоксаном липолиза стимулированного β-агонистом, адипоциты инкубировали с 100 мкМ Mn-TMPyP, 5 мМ аллоксана и 1 мкМ изопротеренола. Mn-TMPyP увеличивал в 1,5 раза концентрацию глицерола в среде инкубации адипо-

цитов до 1,08 (1,04...1,15) мкмоль/10⁶ клеток. Генерация O₂^{•-} при действии аллоксана играет важную роль и в ингибировании диабетогеном стимулированного изопротеренолом липолиза. Ловушка O₂^{•-} – Mn-TMPyP (100 мкМ) – достоверно повышает сниженный под действием аллоксана стимулированный β-агонистом липолиз. Эти данные свидетельствуют о том, что в механизмах ингибирующего эффекта аллоксана на стимулированный липолиз важную роль играет O₂^{•-}. В тоже время, уровень глицерола в среде инкубации оставался ниже, чем в экспериментах с адипоцитами, инкубированными без аллоксана (рис. 2). Это может быть обусловлено тем, что в реакции восстановления аллоксана в адипоцитах наряду с продукцией АФК образуются радикалы диабетогена – НА[•] [20, 21] (рис. 1), которые не инактивируются ловушкой O₂^{•-} Mn-TMPyP и могут повреждать липиды и белки, участвующие в трансдукции гормонального сигнала.

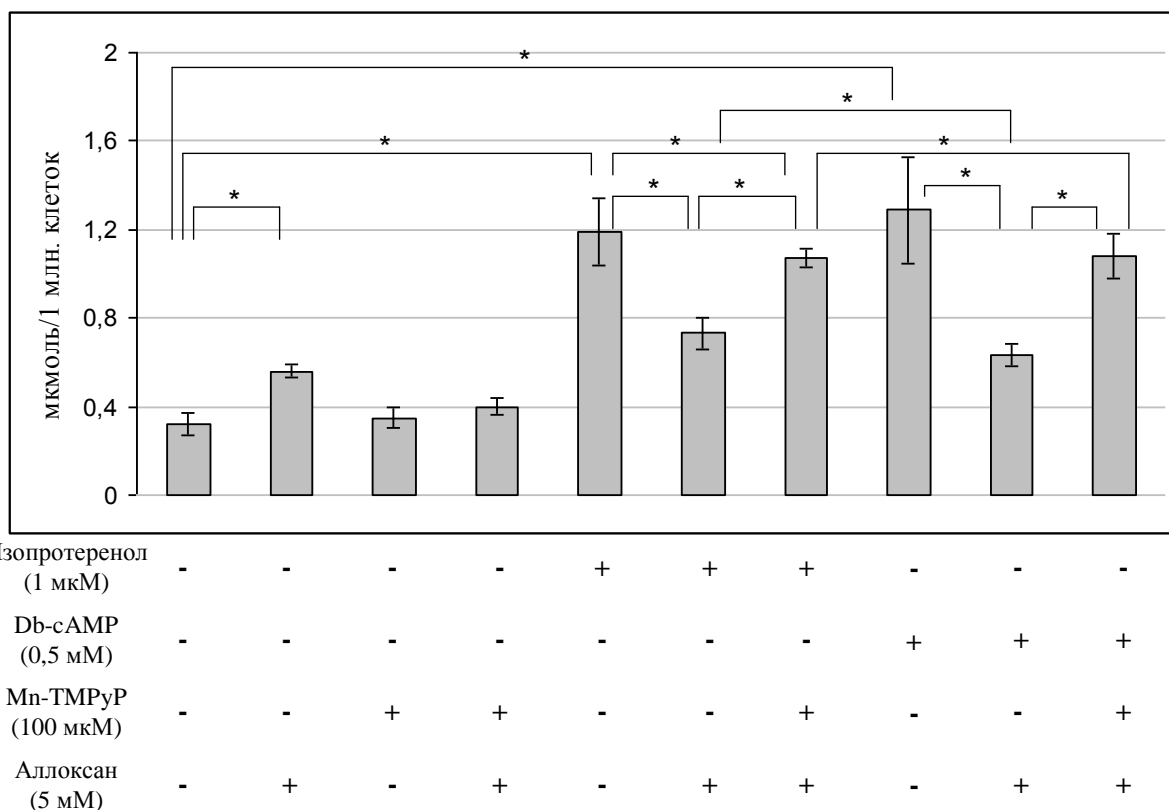


Рис. 2. Влияние стимулятора β₂-адренорецепторов изопротеренола, аналога цАМФ – N(6)-2'-дibuтирил-цАМФ (Db-cAMP), ловушки супероксидного анион-радикала – марганец-тетра (N-метил-4-пиридил) порфирина (Mn-TMPyP) и аллоксана на липолиз в адипоцитах интактных крыс (концентрация глицерола в среде инкубации жировых клеток). Примечание: значения представлены в виде медианы и межквартильного размаха. «*» – p<0,05 уровень статистической значимости различий по сравнению с адипоцитами соответствующей группы

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в механизмах ингибирования стимулированного изопротеренолом липолиза важную роль играет генерация O₂^{•-} в реакции превращения аллоксана в диалуровую кислоту.

Для уточнения механизмов ингибирующего эффекта аллоксана на стимулированный β-агонистом липолиз, нами было исследовано влияние Mn-TMPyP на липолиз, стимулированный негидролизуемым внутриклеточными эстеразами, проникающим в клетку аналогом цАМФ – Db-cAMP.

Инкубация адипоцитов с 0,5 мМ Db-cAMP приводила к стимуляции липолиза. Концентрация глицерола в среде инкубации при этом составляла 1,29 (1,11...1,34) мкмоль/10⁶ клеток, что в 4,0 раза было выше содержания глицерола в среде инкубации без стимуляции липолиза, составившего 0,32 (0,26...0,32) мкмоль/10⁶ клеток (рис. 2). Добавление 5 мМ аллоксана к

адипоцитам снижало стимулированный 0,5 мМ Db-cAMP липолиз. Концентрация глицерола в среде инкубации уменьшалась в 2,1 раза и составляла 0,63 (0,55...0,64) мкмоль/10⁶ клеток (рис. 2). Ловушка супероксидного анион-радикала Mn-TMPyP (100 мкМ) в присутствии 0,5 мМ Db-cAMP и 5 мМ аллоксана повышала содержание глицерола в инкубационной среде адипоцитов до 1,08 (1,01...1,10) мкмоль/10⁶ клеток, при этом его уровень существенно не отличался от концентрации глицерола в среде инкубации адипоцитов с Db-cAMP без аллоксана (рис. 2).

Таким образом, ловушка O₂^{•-} Mn-TMPyP предотвращает вызванную аллоксаном активацию спонтанного липолиза и частично снимает ингибирующее действие диабетогена на стимулированный изопротеренолом и полностью на Db-cAMP индуцированный липолиз. Эти данные свидетельствуют о том, что в механизмах ингибирующего эффекта аллоксана на стимулированный липолиз важную роль играет генерируемый в ходе превращения аллоксана в диалуровую кислоту O₂^{•-}. Тот факт, что ингибирующее действие аллоксана на стимулированный липолиз предотвращается ловушкой O₂^{•-} Mn-TMPyP как при стимуляции изопротеренолом, так и при Db-cAMP позволяет предполагать, что мишенью для O₂^{•-} является, главным образом, не аденилатциклаза, а другие компоненты аденилатциклазного пути трансдукции гормонального сигнала. Так показано, что протеинкиназа A чувствительна к микромолярным концентрациям пероксида водорода, в том числе, образующегося в адипоцитах под действием супероксиддисмутазы из O₂^{•-}, генерируемого при активации НАДФН-оксидазы инсулином [31]. Пероксид водорода окисляет SH-группы цистеина в составе каталитических и регуляторных субъединиц фермента, что препятствует взаимодействию протеинкиназы A с цАМФ и ее дальнейшей активации. Можно предполагать, что ингибирование стимулированного липолиза в адипоцитах при стимуляции окислительного стресса аллоксаном обусловлено изменением тиолдисульфидного обмена в жировых клетках, поэтому в следующей серии экспериментов нами было исследовано влияние блокатора SH-групп N-этилмалеимида на липолиз и систему глутатиона в жировых клетках.

Для оценки участия глутатиона в защите белков адипоцитов от окислительной модификации и его роли в поддержании функциональной активности клеток, адипоциты инкубировали с блокатором SH-групп NEM. NEM способен проникать в клетки и связывать преимущественно SH-группы глутатиона, поскольку GSH выступает главным неферментативным антиоксидантом клетки, поставляющим восстановленные тиоловые группировки в реакциях антиоксидантной защиты [32]. NEM при взаимодействии с глутатионом образует стабильные комплексы глутатион-NEM без перехода GSH в окисленное дисульфидное состояние [32]. SH-группы, связанные с NEM, теряют способность взаимодействовать с АФК и препятствовать развитию окислительного стресса.

В результате экспериментов было установлено, что блокирование функциональных SH-групп глутатиона в адипоцитах приводило к увеличению концентрации GSSG к снижению содержания общего глутатиона и GSH, а также уменьшению величины отношения восстановленной формы трипептида к окисленной. Так инкубация адипоцитов с 0,2 мМ и 0,8 мМ NEM приводила к снижению содержания общего глутатиона в адипоцитах 1,2 раза в обоих случаях по сравнению с контрольными величинами, составившими 25,99 (23,17...26,85) нмоль/мг белка (рис. 3). Концентрация GSH в адипоцитах, инкубированных с 0,2 мМ NEM, снижалась до 19,09 (18,78...19,26) нмоль/мг белка, достигая минимальных значений в жировых клетках, инкубированных с 0,8 мМ NEM, составивших 17,21 (13,73...17,68) нмоль/мг белка (рис. 3).

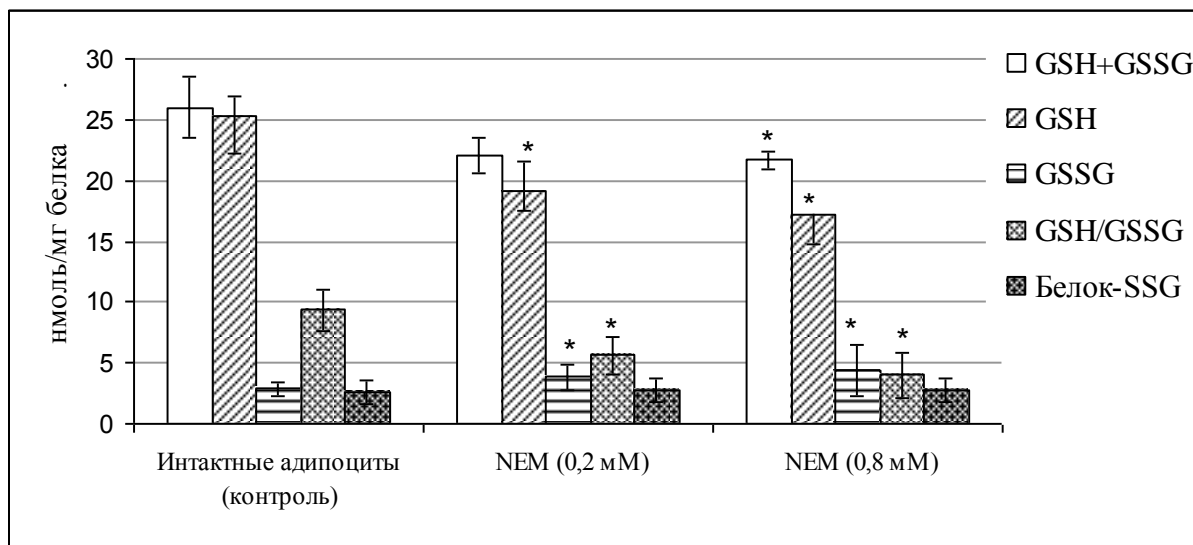


Рис. 3. Параметры системы глутатиона адипоцитов при добавлении блокатора SH-групп N-этилмалеимида (NEM) в концентрациях 0,2 мМ и 0,8 мМ. Примечание: значения представлены в виде медианы и межквартильного размаха. «*» – $p < 0,05$ уровень значимости различий по сравнению с интактными адипоцитами

С возрастанием в среде инкубации клеток концентрации NEM от 0,2 мМ до 0,8 мМ в адипоцитах повышалось содержание GSSG без существенного увеличения белковосвязанного глутатиона. Так концентрация GSSG составила 3,82 (4,20...6,50) нмоль/мг белка и 4,36 (2,00...4,20) нмоль/мг белка в адипоцитах, инкубированных с 0,2 мМ и 0,8 мМ NEM, соответственно, что в 1,4 и 1,5 раза было выше контрольных значений – 2,86 (2,70...2,93) нмоль/мг белка (рис. 3).

Известно, что GSH расходуется в ходе ряда окислительно-восстановительных реакций как поставщик SH-групп, защищающих макромолекулы клетки от OH^- и других АФК. SH-группа глутатиона окисляется гораздо легче, чем SH-группы в белковых молекулах, и за счет этого реализуется защита макромолекул от необратимой окислительной модификации [18].

Можно предполагать, что при окислительном стрессе в адипоцитах, вызванном блокатором SH-групп NEM, часть GSH может расходоваться для защиты SH-групп белковых молекул путем обратимого связывания с ними. Однако это способствует уменьшению восстановительного потенциала системы глутатиона. Подтверждением этого предположения является обнаруженное нами в адипоцитах достоверное снижение величины отношения GSH/GSSG с увеличением концентрации NEM в среде инкубации клеток (рис. 3).

Таким образом, с возрастанием концентрации NEM в среде инкубации клеток происходит увеличение содержания GSSG и белковосвязанного глутатиона и снижение концентрации GSH и величины отношения GSH/GSSG в адипоцитах.

Инкубация адипоцитов с 0,2 мМ NEM приводила к увеличению концентрации глицерола в среде инкубации клеток в 1,3 раза по сравнению с контрольными значениями, составившими 0,27 (0,27...0,30) мкмоль/ 10^6 клеток (рис. 4).

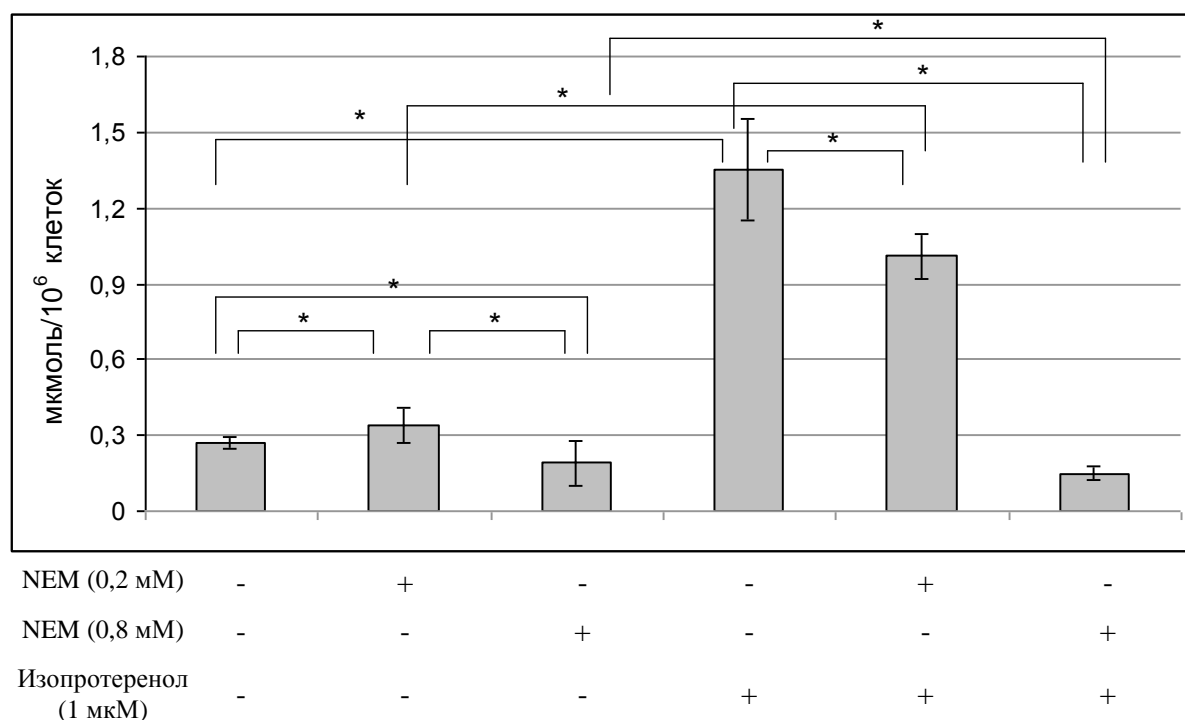


Рис. 4. Влияние агониста β_2 -адренорецепторов изопроterenола и блокатора SH-групп N-этилмалеимида (NEM) на липолиз в адипоцитах. Примечание: значения представлены в виде медианы и межквартильного размаха. «*» – $p < 0,05$ уровень значимости различий по сравнению с адипоцитами соответствующей группы

Увеличение концентрации блокатора SH-групп NEM до 0,8 мМ приводило к противоположному эффекту – концентрация глицерола в инкубационной среде снижалась в 1,3 раза по сравнению с контрольными значениями (рис. 4). Это может быть следствием токсического влияния высоких концентраций NEM на адипоциты.

Инкубация адипоцитов с 0,2 мМ NEM и 1 мкМ изопроterenола способствовала снижению содержания глицерола в среде инкубации клеток в 1,3 раза по сравнению с аналогичным показателем в адипоцитах, инкубированных с 1 мкМ изопроterenола без NEM, составившим 1,01 (0,96...1,05) мкмоль/ 10^6 клеток (рис. 4). Действие 0,8 мМ NEM на стимулированный изопроterenолом (1 мкМ) липолиз еще в большей степени (в 6,7 раза) вызывало снижение концентрации глицерола в среде инкубации адипоцитов по сравнению с аналогичным показателем в адипоцитах, инкубированных с 1 мкМ изопроterenола без NEM (рис. 4).

Таким образом, блокатор SH-групп NEM в адипоцитах так же как и аллоксан способствует активации спонтанного и ингибированию стимулированного изопроterenолом липолиза. Это свидетельствует об участии супероксидного анион-радикала кислорода и глутатиона в регуляции липолиза в адипоцитах при аллоксановом диабете, сопровождающимся окислительным стрессом.

Заключение

Аллоксан (5мМ) *in vitro* в изолированных адипоцитах вызывает окислительный стресс, что сопровождается активацией спонтанного и ингибированием стимулированного изопроterenолом липолиза. Ловушка $O_2^{\cdot-}$ – Mn-TMPyP (100 мкМ) – предотвращает увеличение спонтанного липолиза и ингибирование стимулированного β -агонистом адренорецепторов липолиза, что свидетельствует об участии супероксидного анион-радикала кислорода в модуляции липолиза в адипоцитах при окислительном стрессе, индуцированном диабетогеном в жировых клетках. Блокатор SH-групп NEM (0,2 мМ; 0,8 мМ) в адипоцитах снижает концентрацию общего и восстановленного глутатиона и повышает содержание окисленной формы трипептида без

существенного изменения уровня белковосвязанного глутатиона. Существенное уменьшение величины отношения GSH/GSSG при инкубации клеток с NEM свидетельствует о снижении потенциала системы глутатиона в адипоцитах и также сопровождается активацией спонтанного и ингибированием стимулированного изопротеренолом липолиза.

Снижение антиоксидантного потенциала и активация свободнорадикального окисления приводит к повышенной окислительной модификации липидов и белков в адипоцитах. Возникающая при активации ПОЛ дезинтеграция фосфолипидного монослоя на поверхности жировой капли в условиях окислительного стресса в адипоцитах повышает доступность триацилглицеролов действию липаз и активирует спонтанный липолиз [33]. Увеличение активности спонтанного липолиза в условиях окислительного стресса, вызванного аллоксаном, может являться одной из причин повышенного содержания свободных жирных кислот в плазме крови при экспериментальном диабете, что может играть важную роль в развитии инсулинорезистентности и возникновении осложнений СД.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism // *Diabetes*. – 2005. – V. 54. – P. 1615–1625.
2. Newsholme P., Haber E.P., Hirabara S.M. et al. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity // *J. Physiol.* – 2007. – V. 583. – № 1. – P. 9–24.
3. Pérez-Matute P., Zulet M.A., Martínez J.A. Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2009. – V. 9. – № 6. – P. 771–779.
4. Giacco F., Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications // *Circ. Res.* – 2010. – V. 107. – № 9. – P. 1058–1070.
5. Victor V.M., Rocha M., Herance R. et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes // *Curr. Pharm. Des.* – 2011. – V. 17. – № 36. – P. 3947–3958.
6. Folli F., Corradi D., Fanti P. et al. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus micro- and macrovascular complications: avenues for a mechanistic-based therapeutic approach // *Curr. Diabetes Rev.* – 2011. – V. 7. – № 5. – P. 313–324.
7. Kaneto H., Katakami N., Kawamori D. et al. Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2007. – V. 9. – № 3. – P. 355–366.
8. Rains J.L., Jain S.K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes // *Free Radic. Biol. Med.* – 2011. – V. 50. – № 5. – P. 567–575.
9. Колесник Ю.М., Орловский М.А. Панкреатические островки: некоторые аспекты морфологии, физиологии и процессов деструкции при сахарном диабете типа // *Проблемы эндокринологии*. – 2004. – Т. 50. – № 2. – С. 3–10.
10. Chen J., Gusdon A.M., Thayer T.C. et al. Role of increased ROS dissipation in prevention of T1D // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – V. 1150. – P. 157–166.
11. Bloch-Damti A., Bashan N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2005. – V. 7. – № 11–12. – P. 1553–1567.
12. Davi G., Falco A., Patrono C. Lipid peroxidation in diabetes mellitus // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2005. – V. 7. – № 1–2. – P. 256–268.
13. Houstis N., Rosen E.D., Lander E.S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance // *Nature* – 2006. – V. 440. – № 7086. – P. 944–948.
14. Eriksson J.W. Metabolic stress in insulin's target cells leads to ROS accumulation – a hypothetical common pathway causing insulin resistance // *FEBS Lett.* – 2007. – V. 581. – № 19. – P. 3734–3742.
15. Lenzen S. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell // *Biochem. Soc. Trans.* – 2008. – V. 36. – № 3. – P. 343–347.
16. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты. – Спб.: Медицинская пресса, 2006. – 400 с.

17. Зоров Д.Б., Банникова С.Ю., Белоусов В.В. и др. Друзья или враги. Активные формы кислорода и азота // Биохимия – 2005. – Т. 70. – № 2. – С. 265–272.
18. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона. I. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы // Биомедицинская химия. – 2009. – Т. 55. – № 3. – С. 255–277.
19. Ayala V., Naudí A., Sanz A. et al. Dietary protein restriction decreases oxidative protein damage, peroxidizability index, and mitochondrial complex I content in rat liver // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. – 2007. – V. 62. – № 4. – P. 352–360.
20. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas // Physiol Res – 2001. – V. 50. – P. 536–546.
21. Elsner M., Gurgul-Convey E., Lenzen S. Relative importance of cellular uptake and reactive oxygen species for the toxicity of alloxan and dialuric acid to insulin-producing cells // Free. Radic. Biol. Med. – 2006. – V. 41. – № 5. – P. 825–834.
22. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes // Diabetologia. – 2008. – V. 51. – № 2. – P. 216–226.
23. Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells // Biol. Chem. – 1964. – V. 239. – P. 375–380.
24. Lei T., Xie W., Han J. et al. Medium-chain fatty acids attenuate agonist-stimulated lipolysis, mimicking the effects of starvation // Obes Res. – 2004. – V. 12. – № 4. – P. 599–611.
25. Kraemer F.B., Shen W.J. Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-) acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis // Lipid. Res. – 2002. – V. 43. – P. 1585–1594.
26. Wieland O.N. Glycerol In Methods of Enzymatic Analysis. – Verlag Chemie, Germany, 1984.
27. Buckley B.J., Whorton A.R. Adaptive responses to peroxynitrite: increased glutathione levels and cystine uptake in vascular cells // Cell Physiol. – 2000. – № 279. – P. 1168–1176.
28. Giudicelli Y., Provins D., Nordmann R. Effects of sulfhydryl inhibition on the regulation of basal lipolysis and glucose uptake in human adipose tissue // Biochem. Pharm. – 1975. – V. 24. – P. 1029–1033.
29. Anderson M.E. Determination of glutathione and glutathione sulfide in biological samples // Methods Enzymol. – 1985. – V. 113. – P. 548–555.
30. Иванов В.В., Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Жаворонок Т.В., Новицкий В.В. Перекисное окисление липидов и система глутатиона в жировой ткани крыс с аллоксановым диабетом // Бюллетень СО РАМН. – 2010. – Т. 30. – № 6. – С. 101–104.
31. De Piña M. Z., Vázquez-Meza H., Pardo J.P. et al. Signaling the signal, cyclic AMP-dependent protein kinase inhibition by insulin-formed H₂O₂ and reactivation by thioredoxin // Biol. Chem. – 2008. – V. 283. – № 18. – P. 12373–12386.
32. Harwood D.T., Kettle A.J., Winterbourn C.C. Production of glutathione sulfonamide and dehydroglutathione from GSH by myeloperoxidase-derived oxidants and detection using a novel LC-MS/MS method // Biochem. J. – 2006. – V. 399. – № 1. – P. 161–168.
33. Иванов В.В., Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Жаворонок Т.В., Новицкий В.В. Влияние аллоксана на спонтанный липолиз и систему глутатиона в изолированных адипоцитах крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 151. – № 3. – С. 288–291.

Поступила 19.07.2012 г.