

Attività della Glutazione S-transferasi (gst) nel fegato di ratti diabetici sottoposti a trattamento antiossidante con n-Acetilcisteina e Taurina

Renata Cordara

ASL 3 Genovese - Unità Operativa Igiene e Sanità Pubblica - Dipartimento di Prevenzione

ABSTRACT

Effects of supplemental n-Acetylcysteine and taurine on the activity of liver Glutathione S-transferase in streptozotocin-induced diabetic rats

The role of oxidative stress in diabetes is currently under discussion, but several alterations in diabetic are oxidative in nature or may depend on increase oxidative oxidative mechanism. It also well known that glycation, which many authors consider to underlie the pathogenesis of diabetic sequelae, is strictly interconnected with diabetes and induce structural and functional modifications of many enzymes. Previous studies suggested that peroxidative aldehydes (MDA =malondialdehyde, HNE = 4-hydroxy-2-nonenal, ecc) accumulation in diabetic liver may depend on both mechanism: increased lipoperoxidation and decreased enzymatic removal. The main enzyme capable of metabolizing peroxidative aldehydes in liver and other tissues is Glutathione S-transferase (GST), wich catalyses the coniugation of these to Glutathione (GSH), the major cellular thiol partecipating in cellular redox reactions and thioether formation. In many studies is showed that GST activity is reduced in liver of diabetic rats and peroxidative aldehydes accumulation can generated vicious circles able to amplify the oxidative damage. The results of recents studies suggest that oral supplementation with Thiol-containing antioxidants such as N-Acetylcysteine (NAC) and with Taurine (TAU) to be beneficial for both mantaining natural antioxidant system and protecting against a number of degenerative disease associated with free radical damage and toxin exposure. This study investigate wether NAC and TAU supplementation, improving GSH availability and reducing lipoperoxidation, have influence upon activity of GST.

RIASSUNTO

Il Diabete mellito, considerato un valido modello di invecchiamento accelerato, è caratterizzato da imponenti processi di ossidazione di lipidi, glucidi e proteine, mantenuti ed amplificati dalle alterazioni endocrine e metaboliche che contraddistinguono tale patologia. Uno degli aspetti più rilevanti dell'invecchiamento e di numerosi quadri patologici caratterizzati da "stress ossidativo", è lo squilibrio tra la cinetica produttiva e quella di eliminazione di numerosi prodotti degli stessi processi ossidativi ed in particolare delle principali aldeidi lipoperossidative (LPO) (es MDA, HNE). A livello epatocellulare l'eliminazione delle aldeidi lipoperossidative avviene quasi totalmente attraverso il metabolismo enzimatico ed in particolare per intervento del sistema enzimatico della Glutazione S-transferasi, preposta alla coniugazione di numerosi prodotti dei processi ossidativi con il Glutathione in forma ossidata (GSH), sostanza chiave per il mantenimento dell'omeostasi redox intracellulare. Numerosi studi su ratti diabetici hanno evidenziato un'alterazione dell'attività di numerose isoforme della GST ipotizzando inoltre che tale deficit sostenga un significativo accumulo intracellulare di aldeidi LPO destinato a mantenere e ad amplificare lo stesso danno ossidativo ed a compromettere la capacità detossificante epatocellulare. Con tale studio si è inteso verificare le possibili cause dell'alterazione dell'attività enzimatica della GST anche attraverso gli effetti di un trattamento antiossidante mirato soprattutto al miglioramento della disponibilità di cofattore, alla riduzione dei fenomeni lipoperossidativi, ma privo di interferenze sui processi glicosilativi e glicosidativi.

INTRODUZIONE

E' noto che le principali Aldeidi lipoperossidative (MDA ed HNE) a livello epatocellulare vengono eliminate principalmente con il contributo di tre sistemi enzimatici, ovvero la GST, che presiede alla coniugazione di almeno 50-60 % di esse con il GSH, l' Aldeide-Deidrogenasi (ALDH), deputato alla via ossidativa NAD-dipendente e l'Alcool-Deidrogenasi (ADH), preposto alla via riduttiva NADH-dipendente (1) (Figura 1). Ciascuno di tali sistemi, ubiquitario non solo per sede tissutale, ma anche per comparti-

mento cellulare, è caratterizzato da significative variazioni inter e intraspecifiche, ulteriormente modulate dal sesso, dall'età e da peculiari contingenze fisiopatologiche (2), tuttavia, il sistema della GST è tradizionalmente dotato anche di una notevole versatilità non solo catalitica, ma anche funzionale (Figura 1), che ne fa una struttura chiave nei processi di detossificazione cellulare di numerose sostanze (1, 3, 4). Nei ratti diabetici, dove si è osservata l'esistenza di uno squilibrio tra la cinetica di produzione e quella di smaltimento dell' MDA e dell' HNE ed una marcata compromissione della capacità detossificante epatocel-

lulare (4), molti Autori hanno verificato, soprattutto a livello epatico e renale, delle modificazioni significative dell'attività di numerose isoforme della GST(4, 5, 6, 7, 8, 9,10, 11). Benchè i dati non siano univoci, per la maggior parte degli Autori, nei ratti resi diabetici con Alloxana e/o con Streptozotocina, l'attività sia della frazione citosolica che di quella mitocondriale e microsomiale della GST epatocellulare tenderebbe a ridursi significativamente (4, 6, 7, 8, 9, 10, 11), spesso in concomitanza di un marcato decremento del suo cofattore, il GSH, sostanza chiave per il mantenimento dell'omeostasi redox intracellulare (5, 7, 8, 9, 10). Con tale indagine si è inteso confermare se anche nel nostro modello animale vi fosse una reale e significativa modificazione dei livelli di attività enzimatica e verificare se aumentando la disponibilità del GSH, migliorando così contemporaneamente sia la disponibilità di cofattore che l'equilibrio redox intracellulare (7, 12), fosse possibile normalizzare o almeno migliorare l'attività enzimatica, probabilmente alterata inizialmente da squilibri endocrini e metabolici causati da modifiche della glicemia, dell'insulinemia e della glucagonemia (7, 9, 11, 13, 14) e successivamente dal complesso dei fenomeni glico-liposidativi e dal concomitante "stress carbonilico" (glicazione, autossidazione degli zuccheri, lipoperossidazione seguiti da glicossidazione, lipossidazione e proteoperossidazione) (4, 15, 16, 17, 18, 19). Pertanto, parte degli animali diabetici hanno subito un trattamento combinato mirato a limitare selettivamente il danno lipoperossidativo (20, 22) e la sequenziale formazione di ALEs, senza influenzare in alcun modo le alterazioni endocrine e metaboliche soprattutto a carico dell'insulina e della glicemia, nonché i processi di glicosilazione non enzimatica con successiva formazione di AGEs e quelli di ossidazione delle proteine. La miscela antiossidante somministrata conteneva infatti Taurina (TAU), un betaaminoacido ubiquitario, dotato di

numerose funzioni di natura non strutturale, che, attraverso meccanismi multipli, tra i quali una stabilizzazione delle membrane cellulari, pare eserciti una discreta protezione tissutale soprattutto dai danni lipoperossidativi (20, 22) migliorando nel contempo anche l'equilibrio GSH/ GSSG e NAD/ NADH (20, 21, 22, 23). La miscela antiossidante somministrata conteneva tuttavia anche grosse quantità di N-acetilcisteina (NAC), le cui proprietà antiossidanti, verificate soprattutto sul sistema cardiovascolare e sulla muscolatura striata (24, 25), si ritiene siano legate ad un aumento della disponibilità di Cisteina per la sintesi di GSH (12, 25). L'efficacia della somministrazione di NAC, per molti Autori, è amplificata dalla somministrazione contemporanea di peculiari antiossidanti (25), tra i quali la stessa TAU, che a livello epatocellulare è strettamente affiancata alla NAC nel "ciclo della Metionina e nella via di transulfurazione" (Figura 2) (23).

MATERIALI E METODI

Trattamenti animali

Sono stati utilizzati 54 ratti maschi di tipo Spague Dawley (Hsd-SD-sd- BR) mantenuti, in normali condizioni di stabulazione, con una dieta di tipo semisintetico standard. Gli antiossidanti sono stati somministrati con l'approvvigionamento idrico, contenente quotidianamente, per metà dei ratti diabetici, 2,5 gr di TAU e 400 mg di NAC. Il Diabete è stato indotto con iniezione intraperitoneale di Streptozotocina (55-60 mg/Kg di peso), considerando significativi dello stato patologico valori glicemici > 200mg/dl. Fin dall'inizio si sono monitorati a giorni alterni il peso e la glicemia, con prelievo ematico da una vena della coda e successiva lettura riflettometrica delle strisce reattive Haemoglucotest (Reflolux S, Boehringer Mannheim, Germany). Nei ratti diabetici si è provveduto, inoltre,

Metabolismo enzimatico epatocellulare delle principali Aldeidi lipoperossidative (MDA, HNE) e di altri prodotti dei processi ossidativi

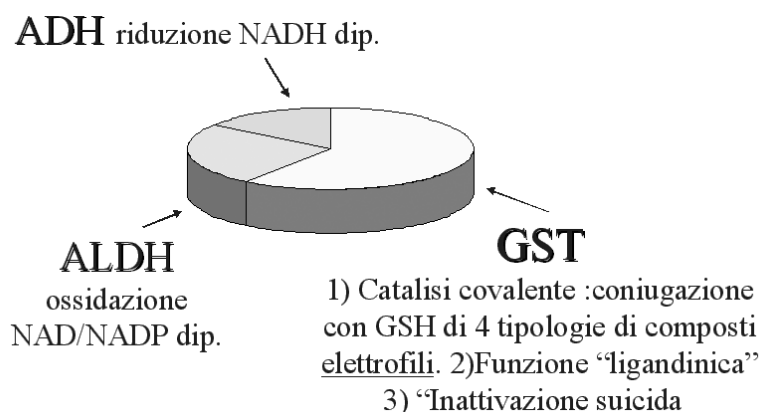


Figura 1

Metabolismo enzimatico epatocellulare delle principali aldeidi lipoperossidative e di altri prodotti dei processi ossidativi

alla valutazione sporadica della Emoglobina glicata mediante analisi cromatografica (Glycaffin; Isolab, Akron, OH, USA) I sacrifici, su animali anestetizzati con iniezione intraperitoneale di Pentobarbital (65 mg/Kg di peso corporeo), sono stati eseguiti per i primi 27 ratti dopo 4 mesi, ovvero dopo un periodo di 2 mesi di diabete, mentre per gli altri 27 ratti dopo 8 mesi, ovvero dopo 6 mesi di patologia diabetica. In funzione dei dosaggi di attività enzimatica programmati, parte del fegato prelevato al momento del sacrificio, è stato immediatamente omogeneizzato in Hepes KCl e congelato a -80° .

Valutazione dell'attività enzimatica

L'attività enzimatica, valutata seguendo le indicazioni del metodo Habig (26), è stata testata su aliquote di omogenato madre diluite in Tampone K-Fosfato 125 mM a pH 6,5 a "figlie teoriche" 0,5 mg/ml. La miscela di reazione finale (1ml) contiene come cofattore Glutazione ridotto 1mM e come substrato 1cloro-2,4 dinitrobenzene (CDNB) 1mM, ovvero, uno tra i substrati che, in base alle indicazioni della letteratura, consente il dosaggio di quelle isoforme più compromesse durante la patologia diabetica, in quanto più sensibili a variazioni della glicemia, dell'insulinemia e della glucagonemia (6). L'attività è stata testata alla temperatura costante di 25° monitorando spettrofotometricamente (strumento UVIKON 943) per 10 minuti le modificazioni di assorbanza a 340 nm di lunghezza d'onda dovute alla formazione del coniugato GS-CDNB. L'unità di attività, definita come la quantità di enzima che catalizza, in peculiari condizioni di dosaggio, la formazione di 1 micromole di prodotto per minuto e calcolata in base ad un coefficiente di estinzione molare di $9600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, è stata successivamente ulteriormente definita per mg di proteina ed espressa definitivamente in nanomoli/minuto/mg proteina (26). Per il dosaggio proteico si è fatto

riferimento al metodo Lowry et al. (27).

Analisi statistica.

Con l'utilizzo del programma Graph Pad Prism (GraphPad, San Diego, CA, USA) è stata eseguita un'Analisi della Varianza completata da Test di Bonferroni e si è considerato significativo un $p < 0.05$. I dati sono presentati in Figura 3 e 4 come *media aritmetica dell'attività (nanomoli/minuto/mg proteina) e deviazione standard (SD)*.

RISULTATI

Il monitoraggio degli animali è stato caratterizzato dai seguenti risultati: il peso iniziale di circa 200 gr, è salito, nei controlli, a 450 gr dopo 4 mesi ed a 600 gr dopo 8 mesi mentre si mantenuto stabilmente intorno a 350-400 gr in tutti gli animali diabetici; i valori glicemici, stabilmente compresi nei controlli tra 85-110 mg/dl, oscillavano invece in tutti gli animali diabetici tra 450-550 mg/dl; anche l'Emoglobina glicosilata è risultata significativamente e stabilmente elevata in tutti gli animali diabetici.

Non si evidenzia rilevante devianza tra identici gruppi di animali di diversa età dove si è potuto costantemente verificare un significativo decremento dell'attività enzimatica delle isoforme per il CDNB in tutti gli animali diabetici. Anche la devianza entro ciascun gruppo non è significativa. I ratti controllo evidenziano un'attività di $236,4 \pm 11,526$ nm/min/mg proteina a 4 mesi (figura 3) e di $236,138 \pm 20,138$ nm/min/mg prot. a 8 mesi (Figura 4), che si riduce a $175,21 \pm 5,805$ nm/min/mg prot. negli animali diabetici di 4 mesi (p vs ctr < 0.001) (figura 3) e a $177,493 \pm 26,75$ nm/min/mg prot in quelli di 8 mesi (p vs ctr < 0.001) (figura 4). Anche gli animali diabetici trattati con antiossidanti evidenziano un identico e significativo calo

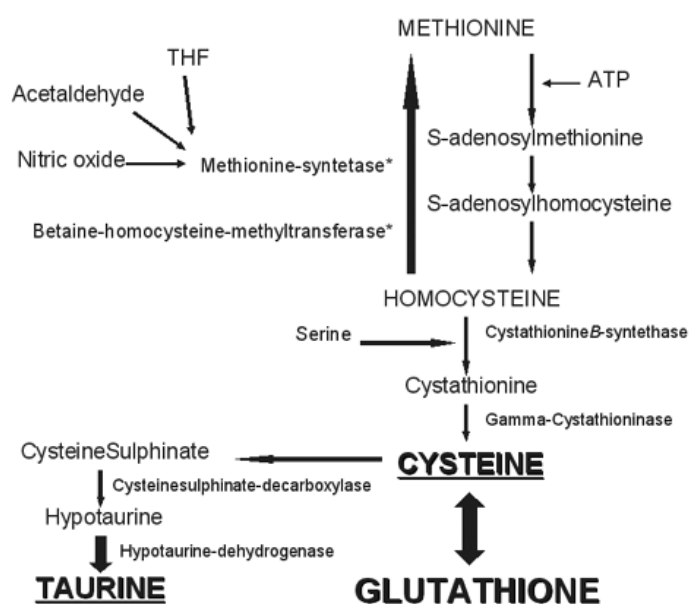


Figura 2
The methionine cycle and transsulfuration pathway in liver

dei livelli di attività a $178,833 \pm 11,091$ nm/min/mg prot dopo 4 mesi (p vs ctr <0,001; p vs **udiab (Diabetici non trattati)** >0,05) (figura 3) ed a $169,083 \pm 13,303$ nm/min/mg prot. dopo 8 mesi (p vs ctr <0,001; p vs **udiab (Diabetici non trattati)** >0,05) (figura 4), confermando l'inutilità di tale trattamento antiossidante e l'ipotesi di un'alterazione della specifica attività enzimatica attraverso ulteriori meccanismi multipli che concorrono ad alterare anche l'attività degli altri due principali sistemi enzimatici (ADH e ALDH) preposti al metabolismo delle Aldeidi lipoperossidative e di altri prodotti dei processi ossidativi (1, 4, 19, 28, 30).

DISCUSSIONE

I risultati confermano, nel nostro modello animale patologico, una significativa riduzione del principale enzima epatocellulare legato all'eliminazione delle Aldeidi lipoperossidative e di numerose sostanze tossiche. Il trattamento animale, analogamente a quanto riferito da altri Autori (22), non ha apportato alcun miglioramento né attraverso un miglioramento della disponibilità di cofattore (12, 25) né con una limitazione del danno lipoperossidativo (20, 22). Molti Autori ipotizzano che alla base di tale fenomeno, che compromette la capacità di detossificazione epatocellulare nei confronti di numerose sostanze amplificando il

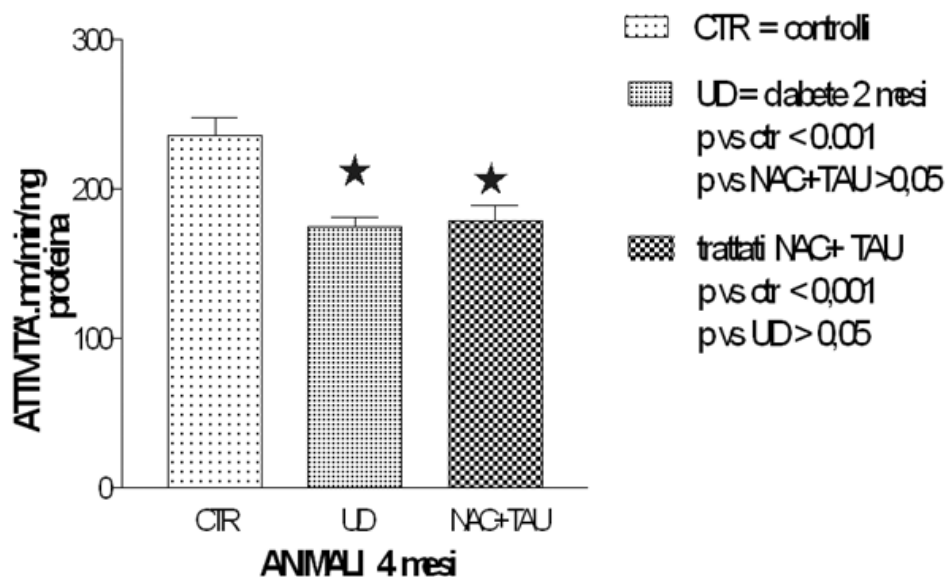


Figura 3
Attività 'gst in ratti di 4 mesi

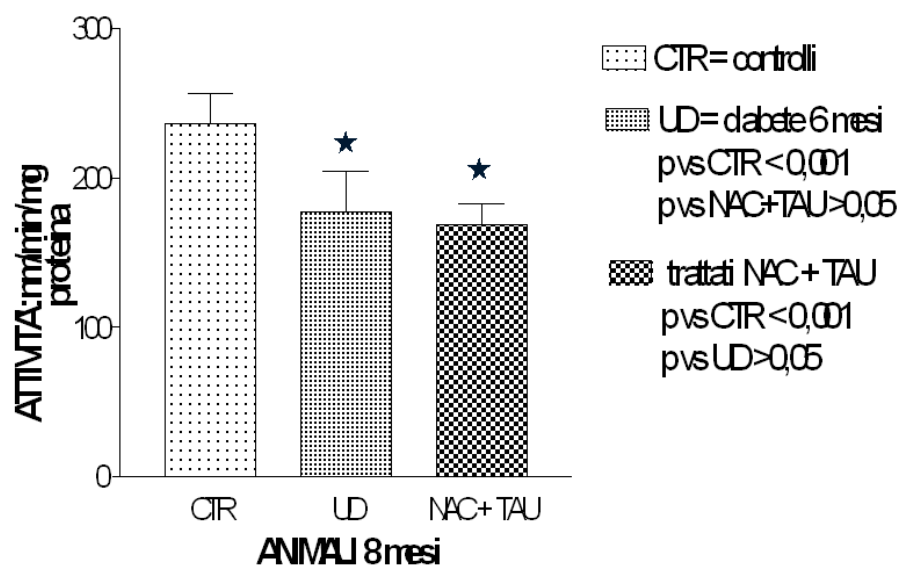


Figura 4
Attività 'gst in ratti di 8 mesi

danno ossidativo (4, 10), vi siano alterazioni strutturali e funzionali delle proteine enzimatiche causate inizialmente da meccanismi di glicosilazione non enzimatica (4, 15, 16, 26) e successivamente da più complessi fenomeni di glico-lipossidazione destinati ad amplificarsi e nell'ambito di uno stato di "stress ossidativo e carbonilico" permanente, al quale probabilmente contribuirebbe anche il difetto dei principali sistemi enzimatici detossificanti (4, 16, 17, 18, 30). L'inefficacia del trattamento animale con NAC + TAU, mirato soprattutto ad incrementare la disponibilità di cofattore (12, 25) ed a ridurre i fenomeni lipoperossidativi (20, 22, 23), induce pertanto a supporre che le modificazioni dell'attività enzimatica della GST siano probabilmente correlate, almeno inizialmente, come sostengono alcuni Autori (6, 7, 9, 10, 13, 14), anche ad alterazioni della glicemia, dell'insulinemia e della glucagonemia, responsabili, come sostengono Altri (4, 16, 17, 28) di processi di glicosilazione non enzimatica. La glicosilazione e l'autossidazione degli zuccheri, peculiari della patologia diabetica, contribuirebbero in modo significativo al mantenimento ed all'amplificazione del danno ossidativo (4, 14, 15, 16, 17, 28), definito propriamente "danno glicossidativo" (29) e, più tardivamente sosterrrebbero più complessi fenomeni di lipo e di glicossidazione con aumento di AGEs e di ALEs (15, 16, 17) e soprattutto con tardive ed irreversibili modificazioni morfofunzionali di proteine strutturali, recettoriali e soprattutto enzimatiche (18, 19, 30), come la GST, la cui attività in tale lavoro è risultata significativamente alterata nonostante un trattamento mirato a migliorare la disponibilità di cofattore. Pertanto, se negli animali sacrificati dopo 4 mesi, ovvero dopo 2 mesi di patologia diabetica, l'alterazione dell'attività della GST potrebbe essere sostenuta dallo squilibrio endocrino- metabolico e da precoci fenomeni glicosilativi, è del tutto probabile che in quelli sacrificati dopo 8 mesi, cioè dopo 6 mesi di diabete, essa sarebbe causata dalle profonde alterazioni proteiche morfofunzionali conseguenti ai processi di glico- lipo- proteoperossidazione.

BIBLIOGRAFIA

- Hartley DP, Ruth JA, Pertersen DR. The epatocellular metabolism of 4-hydroxynonenal by alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, and glutathione S-transferase. *Arch Biochem Biophys* 1995; 316(1): 197-205.
- Egaas E, Falls Jc, Dauterman WC. A study of gender, strain and age differences in mouse liver glutathione S-transferase. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1995; 110(1): 35-40.
- Jakoby WB. Glutathione Transferases: An Overview. *Methods in Enzymology; Glutamate, Glutamine, Glutathione, and Related Compounds* 1985; 13 : 495-515.
- Traverso N, Menini S, Odetti P, Pronzato MA, Cottalasso D, Marinari UM. Diabetes impairs the enzymatic disposal of 4-Hydroxynonenal in rat liver. *Free Radical Biology & Medicine* 2002; 32 (4):350-359.
- Mukherjee B, Mukherjee JR, Chatterjee M. Lipid peroxidation, glutathione levels and changes in glutathione related enzyme activities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Immunol Cell Biol* 1994; 72: 109-114
- Suchocka Z, Kobylinska K, Pachecka J. Activity of glutathione-dependent enzymes in long term diabetes.I. Activity of glutathione S-transferase and glutathione peroxidase in the liver of alloxan induced diabetic rats. *Acta Pol Pharm* 1995; 52 (3):207-211.
- Suchocka Z, Kobylinska K, Pachecka J. Activity of glutathione-dependent enzymes in long term diabetes.II. Glutathione contents and activity of glutathione-dependent enzymes: S-transferase and peroxidase in the kidney cytosol of alloxan induced diabetic rats. *Acta Pol Pharm* 1995; 52 (3): 213-217.
- Mukherjee B, Anbazhagan S, Roy A, Ghosh R, Chatterjee M. Novel implications of potential role of selenium on antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic mice. *Bio-med Pharmacother* 1998; 52 (2): 89-95.
- Raza H, Ahmed I, Yohn A, Sharma AK. Modulation of xenobiotic metabolism and oxidative stress in chronic streptozotocin-induced diabetic rats fed with *Momordica charantia* fruit extract. *J Biochem Mol Toxicol* 2000; 14 (3) : 131-139.
- Gupta RR, Agrawal CG, Shukla GS, Ali B. Cytochrome P450-dependent oxidation and glutathione conjugation of xenobiotics in alloxan-induced diabetic rat. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997; 98 (2): 231-236.
- Thomas H, Schladt L, Knehr M, Oesch F. Effect of diabetes and starvation on the activity of rat liver epoxide hydrolases, glutathione S-transferases and peroxisomal beta-oxidation. *Biochem Pharmacol* 1989; 38 (23): 4291-4297.
- Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology & Medicine* 1999; 27: 916-921.
- Carrillo MC, Monti JA, Favre C, Carnovale CE. Acute regulation of hepatic glutathione S-transferase by insulin and glucagon. *Toxicol Lett* 1995; 76 (2): 105-111.
- Carnovale Ce, Monti JA, Catania VA, Carrillo MC. Possible role of blood insulin levels on glutathione S-transferase activities from different tissues of male rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1990; 68 (2): 170-173.
- Yim MB, Yim HS, Lee C, Kang SO, Chock PB. Protein Glycation: creation of catalytic sites for free radical generation. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 928: 48-53.
- Monnier V. Non-enzymatic glycosylation of proteins. Complications of diabetes mellitus, aging and kidney failure. *Presse Med* 1993; 22 (30): 1413-1418.
- Baynes JW, Thorpe SR. Role of the Maillard reaction in diabetes mellitus and diseases of aging. *Drugs Aging* 1996; 9 (2): 69-77.
- Rodney LL, Earl RS. Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental Gerontol* 2001; 36: 1495-1502.
- Dean RT, Shanliin Fu, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997; 324: 1-18.
- Gurer H, Ozgunes H, Saygin E, Ercal N. Antioxidant effect of taurine against lead-induced oxidative stress. *Arch Environ Contam Toxicol* 2001; 41 (4): 397-402.
- Taurine Monograph. *Altern Med Rev* 2001; 6(1): 78-82.
- Lim E, Park S, Kim H. Effects of taurine supplementation on lipid peroxide formation and the activities of glutathione-related enzymes in the liver and islet of type I and II diabetic model mice. *Adv Exp Med Biol* 1998; 442: 99-103.
- Kerai MDJ, Watherfield CJ, Kenyon SH, Asker DS, Timbrell YA. The effect of taurine depletion by alanine treatment on the susceptibility to ethanol-induced hepatic dysfunction in rats. *Alcohol & Alcoholism* 2001; 36(1): 29-38.
- Pieper GM, Sienbeneich W. Oral administration of the antioxidant, N-acetylcysteine abrogates diabetes-induced endothelial dysfunctions. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32 (1): 102-105.
- Vina J, Sastre J, Anton V, Bruseghini L, Esteras A. Effect of

- aging on glutathione metabolism. Protection by antioxidants. Free radical and Aging. Emerit & B Change 1992; 136- 146.
26. Habig W, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S- transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem 1974; 249: 7130-7134.
27. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Levis-Farr A, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-275.
28. Crabb DW. The of experimental diabethe on liver alcohol dehydrogenase in vivo. Alcohol Clin Exp Res 1986; 10: 77-80.
29. Cottalasso D, Odetti P. Variazioni età- dipendenti dei livelli di glicosidazione. Individuazione, Sviluppo e Validazione di Biomarcatori di Invecchiamento e di Malattie associate con l' Età Avanzata. Atti del Convegno di Ferrara 28- 29 Febbraio 2000: 8.
30. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stess in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm: Diabetes 1999; 48: 1-9.