

14//252 9.14  
(039)

**МАТЕРИАЛЫ  
VIII СЪЕЗДА  
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ  
РАБОТНИКОВ  
РЕСПУБЛИКИ  
БЕЛАРУСЬ**

8-9 апреля 2010 г.

Под общей редакцией В.П.Дейкало

Витебск 2010



## ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА РЕСПИРАТОРНУЮ ФУНКЦИЮ МИТОХОНДРИЙ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ДИАБЕТЕ

Дремза И.К., Лапшина Е.А., Чещевик В.Т., Забралская С.В.,  
Заводник И.Б.

*Государственное учреждение «Научно-производственный центр  
«Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси»*

**Введение.** Сахарный диабет I и II типа является одной из самых распространенных патологий современного общества [1] и характеризуется многообразными метаболическими расстройствами. Установлено, что прогрессирующая гипергликемия при диабете является наиболее важным фактором риска макро- и микрососудистых осложнений, приводящих к поражению сетчатки глаза, почек, центральной нервной системы. Сопровождающие гипергликемию окислительный стресс и нарушение биоактивности оксида азота играют определяющую роль, как в патогенезе диабета, так и его долговременных осложнений [2], приводя к нарушению митохондриальных функций и биоэнергетики клетки, аутоокислению глюкозы, синтезу провоспалительных медиаторов, неферментативному гликозилированию. Митохондриальная система трансдукции энергии, питающая клеточные функции, столь же изящна, как и уязвима: при диабете фактически каждый компонент системы, начиная от комплексов электронтранспортной цепи и до свойств мембранной проницаемости, являются мишенью для различных повреждающих агентов, некоторые из которых - такие как активные формы кислорода (АФК) в значительных количествах образуются в самой митохондрии [3, 4]. В связи с этим, понятие митохондриальных окислительного стресса и повреждения некоторые авторы рассматривают как «антигенные» детерминанты здоровья и продолжительности жизни [5], а в настоящее время постулируется, что генерация АФК в клетке и последующее окислительное повреждение митохондрий определяют как развитие, так и патологические последствия диабета I и II типа.

Цель работы - выяснить механизмы нарушений респираторной активности митохондрий клеток печени крыс при стрептозотоцин-

индуцируемом сахарном диабете и возможность коррекции митохондриальной дисфункции фармакологическими дозами мелатонина.

**Материал и методы исследования.** Эксперименты выполнены на крысах-самцах массой 180-250 г. В экспериментальной модели мы использовали 3 группы животных – «контроль», «диабет», «диабет+мелатонин», включающие по 6 особей. Диабет у крыс инициировали однократным внутрибрюшинным введением стрептозотоцина в дозе 45 мг/кг массы тела. Животные в группе «диабет+мелатонин» получали ежедневно внутрибрюшинно мелатонин (10 мг/кг массы тела) на протяжении 30 суток. Митохондрии клеток печени изолировали методом дифференциального центрифугирования. Скорость дыхания митохондрий регистрировали полярографически в среде инкубации (0.125 М сахарозы, 0.02 М трис-НСI, 0.05 М КСI, 0.02 М  $\text{KН}_2\text{PО}_4$ , 0.005 М  $\text{MgSO}_4$ , 0.001 М ЭДТА, рН 7.5) в присутствии субстратов дыхания (L-глутамата – 5 мМ, сукцината – 5 мМ) и АДФ (200 мкМ). Рассчитывали скорость митохондриального дыхания в различных метаболических состояниях:  $V_1$  – скорость базального дыхания,  $V_2$  – скорость субстрат-зависимого дыхания,  $V_3$  – скорость дыхания, сопряженного с фосфорилированием (после внесения АДФ),  $V_4$  – скорость дыхания после завершения фосфорилирования АДФ и коэффициенты: акцепторного ( $V_3/V_2$ ), дыхательного контроля ( $V_1/V_4$ ), и фосфорилирования – АДФ/О (отношение количества фосфорилированного АДФ к количеству потребленного кислорода).

**Результаты и их обсуждение.** Экспериментальный стрептозотцин-индуцируемый диабет у крыс (30 дней) сопровождался существенными нарушениями респираторной активности изолированных митохондрий клеток печени. Так, скорость базального дыхания ( $V_1$ ) уменьшалась на 15-20%. В случае использования сукцината в качестве респираторного субстрата, скорость дыхания ( $V_2$ ) и скорость дыхания после завершения фосфорилирования АДФ ( $V_4$ ) не изменялись, но скорость АДФ-стимулированного дыхания ( $V_3$ ) уменьшалась на 25% (со  $140,9 \pm 10,7$  до  $107,4 \pm 7,6$  нг ат О/мин·мг белка,  $p < 0,05$ ). Соответственно, значения коэффициентов акцепторного ( $V_3/V_2$ ) и дыхательного контроля ( $V_1/V_4$ ), также значительно уменьшались (на 25%,  $p < 0,01$  и на 27%,  $p < 0,01$ , соответственно). В случае глутамата, как дыхательного субстрата, скорость потребления кислорода митохондриями печени

$V_2$  уменьшалась на 20%. скорость АДФ-стимулированного дыхания ( $V_3$ ) уменьшалась более чем на 35% (со  $104,1 \pm 12,2$  до  $66,0 \pm 4,9$  нг ат О/мин·мг белка,  $p < 0,05$ ) и не изменялась величина скорости  $V_4$ . Значения коэффициентов акцепторного и дыхательного контроля при глутамат-зависимом дыхании также существенно снижались (на 22%,  $p < 0,05$  и на 40%,  $p < 0,05$ , соответственно). Следует отметить, что коэффициент фосфорилирования (АДФ/О) не изменялся при диабетическом поражении печени, свидетельствуя, вероятно, о сохранении эффективности потребления кислорода митохондриями клеток печени при диабете, несмотря на повреждение компонентов дыхательной цепи.

Введение мелатонина в течение 30 дней диабетическим животным (10 мг/кг массы тела, в/б) существенно повышало скорость дыхания  $V_3$  в случае сукцинат- (с  $107,4 \pm 7,6$  до  $134,8 \pm 4,9$  нг ат О/мин·мг белка,  $p < 0,05$ ) и глутамат-зависимого дыхания (с  $66,0 \pm 4,9$  до  $90,6 \pm 4,9$  нг ат О/мин·мг белка,  $p < 0,01$ ). Соответственно, значения коэффициентов акцепторного и дыхательного контроля у диабетических животных, получавших мелатонин, при сукцинат- и глутамат-зависимом дыхании также значительно возрастали и не отличались от таковых для контрольных животных. Следует отметить при глутамат-зависимом дыхании увеличение у животных диабетической группы, получавших мелатонин, значение коэффициента АДФ/О, который возрастал как относительно диабетической, так контрольной и групп (с  $2,24 \pm 0,9$  и  $2,33 \pm 0,8$ , соответственно, до  $2,6 \pm 0,1$ ;  $p < 0,05$ ), свидетельствуя о повышении эффективности фосфорилирования в митохондриях.

Известно, что диабетическая гипергликемия, активируя окислительный стресс, приводит к возрастанию интенсивности четырех альтернативных метаболических путей, играющим ведущую роль в повреждении клеток: 1) полиольного метаболического пути; 2) пути наработки конечных стабильных продуктов гликозилирования, их аутоокисления и взаимодействия с соответствующими клеточными рецепторами; 3) пути активации разнообразных изоформ протеинкиназы С и 4) по гексозаминовому метаболическому пути. Кроме того, высокий уровень АФК не только непосредственно повреждает клетки, неспецифически окисляя ДНК, белки и липиды, но и активирует ряд разно-

образных стресс-индуцируемых внутриклеточных сигнальных каскадов, таких как NF- $\kappa$ B, p38MAPK, JNK/SAPK, гексозаминовый сигнальные пути и другие [6]. С другой стороны, воздействие окислительного стресса на внутриклеточные сигнальные каскады, приводит к развитию воспалительных процессов, резистентности клеток к инсулину и т.д. [7, 8]. Ранее Giardino I. et al. [9] продемонстрировали, что в культивируемых бычьих эндотелиальных клетках аорты гипергликемия увеличивает продукцию АФК даже несколько лет спустя, а несколько позже та же группа исследователей очень изящным способом продемонстрировала, что при гипергликемии источником повышенной генерации АФК является цикл Кребса [10].

Значительное возрастание уровня АФК, индуцируемое гипергликемией, непосредственно снижает (на 65 %) активность эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) в аортах диабетических животных. Однако, в случае введения этим животным нового каталитического антиоксиданта, который работает непрерывно как фермент [11], например, подобно супероксиддисмутазе или каталазе, то не наблюдается уменьшения активности этого важнейшего антиатерогенного фермента. Полученные этими авторами данные в значительной степени предполагают, что терапевтическая коррекция вызванной сахарным диабетом продукции супероксид аниона может дать новый важный подход для предотвращения диабетических осложнений.

Очевидно, что нарушение митохондриальной респираторной активности можно рассматривать как одно из центральных проявлений диабетического поражения клеток печени. Ранее было показано, что введение мелатонина при диабете (10 мг/кг массы тела в течение 6 недель) препятствует развитию окислительного стресса и дисфункции эндотелия [12]. Мелатонин, как сообщалось другими исследователями, улучшал митохондриальную функцию клеток печени при старении [13] и этот эффект интерпретировался как антиоксидантный, а также защищал печеночную митохондриальную дыхательную активность у мышей с ускоренным старением [13].

В нашем эксперименте мелатонин, вводимый в фармакологической дозе животным при диабете, не только предотвращал развитие нарушений респираторной дисфункции митохондрий клеток печени, демонстрируя свою специфическую митохондриальную активность,

но и повышал эффективность фосфорилирования в митохондриях интактных животных. Протекторный эффект мелатонина на респираторную активность митохондриальных клеток печени при диабете, вероятно, можно рассматривать как следствие его метаболического действия, радикал-сквенджерных свойств, специфического взаимодействия с компонентами электронтранспортной цепи митохондрий, регуляторного воздействия на внутримитохондриальные процессы и мембранную проницаемость.

#### Литература

1. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society / P.Rosen [et al.] // *Diabetes Metab. Res. Rev.* – 2001. – V. 17. – P. 189-212.
2. Wolf, S.P. Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications / S.P. Wolf // *Br. Med. Bull.* – 1993. – Vol. 49. – P. 642-652.
3. Addabbo, F. Mitochondria and reactive oxygen species / F. Addabbo, M. Montagnani, M.S. Goligorsky // *Hypertension.* – 2009. – Vol. 53. – P. 885-892.
4. Wallace, K.B. Mitochondrial targets of drug toxicity / K.B. Wallace, A.A. Starkov // *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2000. – Vol. 40. – P. 353-388.
5. Schriener, S.E. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria / S.E. Schriener [et al.] // *Science.* – 2005. – Vol. 308. – P. 1909-1911.
6. Newsholme, P. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity / P. Newsholme [et al.] // *J. Physiol.* – 2007. – Vol. 583, № 1. – P. 9-24.
7. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism / M. Brownlee // *Diabetes.* – 2005. – Vol. 54. – P. 1615-1625.
8. Frydlyand, L.E. Oxidative reactive species in cell injury: Mechanisms in diabetes mellitus and therapeutic approaches / L.E. Frydlyand, L.H. Philipson // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2005. – Vol. 1066. – P. 136-151.
9. Giardino, I. BCL-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation endproducts in bovine endothelial cells / I. Giardino, D. Edelstein, M. Brownlee // *J. Clin. Invest.* – 1996. – Vol. 97. P. 1422-1428.
10. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage / T. Nishikawa [et al.] // *Nature.* – 2000. – Vol. 404. P. 787-790.
11. A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats / D. Salvemini [et al.] // *Science.* – 1999. – Vol. 286. – P. 304-306.

12 Paskaloglu, K. Melatonin treatment protects against diabetes-induced functional and biochemical changes in the rat aorta and corpus cavernosum // k. Paskaloglu, G. Sener, G. Ayangolu-Dulger // *Eur. J. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 499. – P. 345-354

13 Okatani, Y. Melatonin protects hepatic mitochondrial respiratory chain activity in senescence-accelerated mice // Y. Okatani, A. Wakatsuki, R.J. Reiter // *J. Pineal Res.* – 2002. – Vol. 32. – P. 143-148