

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УО «ГРОДНЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

*Наука есть ясное назначение истины, просвещение разума,
непорочное увеселение жизни, похвала юности,
старости подпора, строительница градов, полков,
крепость успеха в несчастии, в счастья украшение,
везде верный и безотлучный спутник.*

М.В. Ломоносов

Актуальные теоретические и прикладные аспекты патофизиологии

*Материалы республиканской конференции
с международным участием
14 мая 2010 г.*

Нацкаянальце
бібліятэка
Беларусі
2010

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДИАБЕТА. КОРРЕКЦИЯ МЕЛАТОНИНОМ ДИСФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ДИАБЕТЕ

Дремза И.К. - к.б.н., доцент, Лапишина Е.А. - к.б.н., вед.н.с.,
Чецевик В.Т. - м.н.с, Заводник Л.Б. - к.м.н., доцент,
Забродская С.В. - к.б.н., доцент, Заводник И.Б. - д.б.н., зав. каф.
биохимии ГрГУ им. Я. Купалы

ГУ «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», отдел биорегуляторов; УО «Гродненский государственный аграрный университет»; УО «Гродненский государственный университет им. Я. Купалы», Гродно, Беларусь, zavodnik_il@mail.ru

The experimental (30-days) streptozotocin-induced diabetes mellitus caused a considerable damage of respiratory activity in rat liver mitochondria. The melatonin administration during diabetes (10 mg/kg BW, 30 days, daily) showed a considerable protective effect on the liver mitochondrial respiration function.

Key words: diabetes, rat liver mitochondria, oxidative stress, melatonin

Введение. Сахарный диабет (инсулин-зависимый и инсулин-независимый) - сложное полифункциональное заболевание и одна из наиболее распространенных патологий современного общества [1], характеризующаяся многообразными метаболическими нарушениями. Как хорошо известно, глюкоза транспортируется через плазматические мембраны в клетки (в том числе и инсулин-секретирующие β -клетки островков Лангерганса поджелудочной железы) специфическими переносчиками (GLUT 1-4) и быстро фосфорилируется с участием фермента глюкокиназы (гексокиназы), обладающей высокой K_m для глюкозы. Процессы транспорта и фосфорилирования определяют скорость метаболического потока глюкозы через гликолиз. Возрастание скорости гликолиза в β -клетках приводит к росту содержания восстановительных эквивалентов в цитоплазме, активации челночного механизма переноса электронов в митохондриальный матрикс, что в конечном итоге приводит к повышению активности цикла Кребса, возрастанию продукции АТФ в митохондриях и увеличению отношения АТФ/АДФ в цитоплазме. Подобным образом, усиленное окисление свободных жирных кислот также приводит к росту отношения НАДН/НАД внутри митохондрий. Возрастание уровня АТФ в цитоплазме β -клетки сопровождается закрытием АТФ-чувствительных K^+ -каналов, уменьшением гиперполяризующего истечения ионов K^+ из клетки и, в свою очередь, деполаризацией плазматической мембраны и входением в клетку ионов Ca^{2+} , активацией протеинкиназ и экзоцитозом инсулина [2],

что представляет собой первичный механизм GSIS (Glucose-stimulated insulin secretion) – стимулируемой глюкозой секреции инсулина.

Эпидемиологические исследования показывают, что прогрессирующая гипергликемия при диабете является наиболее важным фактором риска макро- и микрососудистых осложнений, приводящих к ретинопатии, нефропатии, нейропатии. Гипергликемия вызывает активацию четырех основных метаболических путей, которые играют ведущую роль в повреждении клеток и сопровождаются окислительным стрессом: 1) полиадального метаболического пути; 2) наработки конечных стабильных продуктов гликозилирования (advanced glycation end product, AGE), их аутоокисления и взаимодействия с соответствующими клеточными рецепторами; 3) активации разнообразных изоформ протеинкиназы С (PKC) и 4) возрастания потока глюкозы через гексозаминовый метаболический путь. Молекулярными мишенями активных форм кислорода (АФК) в клетке служат серин/проtein киназы, в том числе и протеинтирозинфосфатазы (protein tyrosine phosphatase, PTP), выступающие в норме как отрицательные регуляторы действия инсулина, катализирующие дефосфорилирование IR (insulin receptors) и IRS (insulin receptor substrates) белков. В настоящее время постулируется, что генерация АФК в клетке и последующее окислительное повреждение митохондрий определяют развитие и патологические последствия диабета I и II типа.

Цель работы – выяснить механизмы дисфункции митохондрий клеток печени крыс при стрептозотоцин-индуцируемом сахарном диабете и возможность коррекции митохондриальных нарушений мелатонином.

Материал и методы исследования. В модели использовали 3 группы животных: «контроль», «диабет», «диабет-мелатонин», в каждой из которых было по 6 особей. Диабет у крыс вызывали 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 изолировали методом дифференциального центрифугирования. Скорость дыхания митохондрий регистрировали полярографически в среде инкубации, включающей 0.125 М сахарозы, 0.02 М трис-НСl, 0.05 М КСl, 0.02 М KH_2PO_4 , 0.005 М MgSO_4 , 0.001 М ЭДТА (рН 7.5) и субстраты дыхания (L-глутамат – 5 мМ, сукцинат – 5 мМ) и АДФ (200 мкМ). Рассчитывали скорость митохондриального дыхания в различных метаболических состояниях: V_1 – скорость базального (эндогенного) 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. Определяли показатели, характеризующие сопряжение процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях: коэффициенты акцепторного (V_3/V_2), дыхательного контроля (V_3/V_4) и фосфорилирования – АДФ/О (отношение количества фосфорилированной АДФ к количеству потребленного кислорода).

Результаты и их обсуждение. Экспериментальный стрептозотоцин-индуцируемый диабет у крыс (30 дней) приводил к выраженному нарушению функциональной активности изолированных митохондрий клеток печени. Скорость базального (эндогенного) потребления кислорода (V_1) уменьшалась на 15-20% (табл. 1).

Таблица 1 – Скорость дыхания митохондрий печени крыс в различных метаболических состояниях при экспериментальном стрептозотоцин-индуцируемом диабете

Группы животных	Скорость базального дыхания - V_1 , (нг ат О/мин)	Скорость дыхания в присутствии субстрата - V_2 , (нг ат О/мин)	Скорость дыхания в присутствии субстрата и АДФ - V_3 , (нг ат О/мин)	Скорость дыхания после фосфорилирования АДФ - V_4 , (нг ат О/мин)
а - субстрат - сукцинат				
Контроль	12,2 ± 1,8	35,7 ± 4,3	140,9 ± 10,7	32,0 ± 3,6
Диабет	9,1 ± 1,4	35,0 ± 2,5	107,4 ± 7,6*	33,5 ± 4,0
Диабет+ мелатонин	11,2 ± 1,5	31,6 ± 3,4	134,8 ± 4,9**	28,14 ± 2,0
б - субстрат - глутамат				
Контроль	14,2 ± 2,1	25,1 ± 2,2	104,1 ± 12,2	17,3 ± 3,4
Диабет	12,0 ± 1,4	20,5 ± 1,1*	66,0 ± 4,9*	18,8 ± 3,1
Диабет+ мелатонин	11,7 ± 1,5	18,6 ± 2,4*	90,6 ± 4,9###	16,1 ± 1,9

* - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ – по сравнению с контролем; # - $p < 0,05$, ### - $p < 0,01$ – по сравнению с группой диабета

В случае сукцината, используемого в качестве респираторного субстрата, скорость субстрат-зависимого дыхания (V_2) и скорость дыхания после фосфорилирования АДФ (V_3) не изменялись, но скорость АДФ-стимулированного дыхания (V_4) уменьшалась на 24% ($p < 0,05$). Соответственно, значения коэффициентов акцепторного (V_3/V_2) и дыхательного контроля (V_3/V_4) (табл. 2), 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 существенно (на 35%, $p < 0,05$) и не изменялась величина скорости V_4 . Значения коэффициентов акцепторного и дыхательного контроля при глутамат-зависимом дыхании также существенно снижались (табл. 2). Обращает на себя внимание тот факт, что коэффициент фосфорилирования (АДФ/О) не изменялся при диабетическом поражении печени (табл. 2), свидетельствуя, вероятно, о сохранении эффективности потребления кислорода митохондриями 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- и глутамат-зависимого дыхания (табл. 1).

Таблица 2 - Коэффициенты, характеризующие процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях печени крыс при экспериментальном стрептозотоцин-индуцируемом диабете

Группы животных	Коэффициент акцепторного контроля (АК) (V_3/V_2)	Коэффициент дыхательного контроля (ДК) (V_3/V_4)	Коэффициент фосфорилирования (АДФ/О)
а - субстрат - сукцинат			
Контроль	4,05 ± 0,19	4,55 ± 0,31	1,86 ± 0,08
Диабет	3,09 ± 0,13**	3,32 ± 0,2**	1,8 ± 0,1
Диабет+ мелатонин	4,46 ± 0,39##	4,91 ± 0,36##	1,86 ± 0,07
б - субстрат - глутамат			
Контроль	4,14 ± 0,32	6,65 ± 0,76	2,33 ± 0,08
Диабет	3,25 ± 0,25*	4,01 ± 0,53*	2,24 ± 0,09
Диабет+ мелатонин	5,26 ± 0,65#	5,84 ± 0,54#	2,6 ± 0,1*#

Соответственно, значения коэффициентов акцепторного и дыхательного контроля для диабетических животных, получавших мелатонин, не отличались от таковых для контрольных животных, а коэффициент АДФ/О повышался относительно групп контроля и диабета, свидетельствуя о повышении эффективности фосфорилирования в митохондриях (табл. 2).

Возрастание при гипергликемии внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , который, активируя РКС, увеличивает НАДФН-оксидазозависимую генерацию АФК, повышает уровень окислительного стресса и/или индуцирует апоптотическую гибель клеток. Активация фермента инициируется путем фосфорилирования сериновых или треониновых остатков субъединицы $p47^{phox}$, катализируемого РКС, что приводит к переносу субъединиц фермента из цитозоля клетки в мембрану [3]. При активации шесть субъединиц «классической» НАДФН оксидазы образуют активный оксидазный комплекс, продуцирующий большое количество супероксид аниона. Избыточный уровень АФК не только непосредственно повреждает клетки, неспецифически окисляя ДНК, белки и липиды, но и активирует ряд разнообразных стресс-индуцируемых внутриклеточных сигнальных каскадов, таких как NF- κ B, p38MAPK, JNK/SAPK, гекозминовый сигнальные пути и другие. Воздействие окислительного стресса на внутриклеточные сигнальные каскады, приводит к развитию воспалительных процессов, резистентности клеток к инсулину и т.д. [4, 5]. Активация сигнальных каскадов приводит к возрастанию экспрессии многочисленных генных продуктов, которые могут быть причиной повреждения клетки и играть определяющую роль в этиологии многих заболеваний, в том числе и в развитии долговременных осложнений диабета. Возрастание степени фосфорилирования остатков серина IRS, в свою очередь, уменьшает его способность претерпевать фосфорилирование остатков тирозина и может ускорять деградацию IRS-1, что представляет собой молекуляр-

Этот механизм стресс-индуцируемой резистентности к инсулину. Знание этих механизмов и сопутствующих осложнений может служить основанием для разработки фармакологических средств коррекции резистентности к инсулину. Использование антиоксидантов и фармакологических ингибиторов стресс-зависимых сигнальных каскадов – один из подходов в разработке указанных средств. Соответственно, использование антиоксидантов и коррекция дисфункции митохондрий может играть выраженную защитную роль при диабете [6].

Нарушения 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 [7]. В нашем эксперименте введение мелатонина в фармакологической дозе животным при диабете предотвращало развитие дисфункции митохондрий клеток печени, демонстрируя специфическую митохондриальную активность мелатонина. Более того, введение мелатонина при диабете в течение 30 дней несколько уменьшало уровень глюкозы и гликозилированного гемоглобина в плазме крови без существенных изменений величины митохондриального мембранного потенциала, уровней внутримитохондриального восстановленного глутатиона, сульфгидрильных групп митохондриальных белков и содержания смешанных дисульфидов глутатиона с митохондриальными белками (данные не представлены).

Выводы. 1. Механизмы, приводящие к генерации активных форм кислорода и окислительному стрессу при диабете, включают нарушение биоэнергетики клетки, аутоокисление глюкозы, синтез провоспалительных медиаторов, неферментативное гликозилирование.

2. Обнаруженный нами протекторный эффект мелатонина на респираторную активность митохондрий клеток печени при диабете может быть связан с его метаболическим действием, радикал-нейтрализующими свойствами и специфическим взаимодействием с комплексами дыхательной цепи митохондрий.

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. 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.
3. Babior, B.M. NADPH oxidase: an update / B.M. Babior // *Blood.* – 1999. – Vol. 93. – P. 1464-1476.
4. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism / M. Brownlee // *Diabetes.* – 2005. – Vol. 54. – P. 1615-1625.
5. 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.*

2005. - Vol. 1066. - P. 136-151.

6. Maritim, A.C III. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review / A.C. Maritim, R.A Sanders, J.B Watkins // *J Biochem. Mol. Toxicol.* - 2003, V. 17. - P. 24-38.
- 7 Paskaloglu, K. Melatonin treatment protects against diabetes-induced functional and biochemical changes in the rat aorta and corpus cavernosum / K.Paskaloglu, G. Senes, G. Ayangolu-Dulger // *Eur. J. Pharmacol.* - 2004. - Vol. 499. - P. 345-354.