



УДК 547.419.5:577.164.15:616.36

Н. В. Кресюн, Л. С. Годлевський, Г. О. Сон

СТАН МЕМБРАН МІТОХОНДРІЙ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ ТА МЕДИКАМЕНТОЗНІЙ КОРЕКЦІЇ

Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

УДК 547.419.5:577.164.15:616.36

Н. В. Кресюн, Л. С. Годлевский, А. А. Сон

СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ И МЕДИКАМЕНТОЗНОЙ КОРРЕКЦИИ

Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

Актуальность. Сахарный диабет имеет значительное распространение, поражает людей работоспособного возраста и вызывает инвалидизирующие осложнения, что требует создания новых подходов к их профилактике и лечению. Экспериментальный стрептозотоцин-индуцированный диабет позволяет изучать патогенез глюкотоксических эффектов и проводить скрининг антидиабетических препаратов.

Цель исследования — изучение состояния мембран митохондрий гепатоцитов при экспериментальном сахарном диабете (СД) и его коррекции производным ниацин-оксиэтилиден-дифосфонато-германатом $(\text{NiCH})_2 [\text{Ge}(\text{OH})_2 (\text{Oedph})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (МИГУ-4) с молярной массой 593 Г/моль.

Материал и методы исследования. Экспериментальный СД моделировали внутрибрюшинным (в/бр) применением стрептозотоцина (СТЗ) ("Sigma Aldrich ru", 50 мг/кг), МИГУ-4 вводили в дозе 25,0 мг/кг, в/бр. Применяли флуоресцентные зонды: универсальный — 1-анилинонафталин-8-сульфонат (1,8-АНС), который электронегативен и погружается в верхнем слое липидного бислоя; гидрофобный — N-фенил-1-нафталин (1-ФНА), имеющий сульфогруппы, который погружается глубоко в липидный бислой (на 8 Å от триметиламиногруппы фосфолипидов). С помощью зондов исследовали: интенсивность флуоресценции (F_{mol}), удельное число центров связывания зонда (N), константу связывания (K_b) и константу диссоциации (K_d) зондов. Выделение мембран проводили путем центрифугирования, контроль чистоты выполняли с помощью световой микроскопии. Флуоресценцию исследовали с помощью спектрофотометра "Opton" (Германия) при длинах волн: для АНС — 360 и 480 нм; для 1-ФНА — 350–420 нм.

Результаты исследования. Через две недели после введения МИГУ-4 уровень глюкозы в крови составил $(15,14 \pm 0,83)$ ммоль/л, через месяц — $(14,02 \pm 0,76)$ ммоль/л, а через 3 мес. — $(10,25 \pm 0,39)$ ммоль/л, в то время как применение инсулина в аналогичные сроки наблюдения обеспечивало снижение содержания глюкозы до $(10,37 \pm 0,95)$; $(8,17 \pm 0,64)$ и $(7,89 \pm 0,39)$ ммоль/л соответственно. F_{mol} зонда 1,8-АНС при сформированном диабете снижалась более чем в 8 раз, K_b зонда, число центров связывания (N) зонда возрастали в 5 раз, а константа диссоциации (K_d) уменьшалась более чем в 4 раза. F_{mol} зонда 1-ФНА у крыс с диабетом снижалась на 61,2 %, показатель N возрастал более чем в два раза. На фоне применения МИГУ-4 указанные нарушения выраженным образом устранялись, хотя сохранялись отличия от показателей в группе контроля. При совместном применении МИГУ-4 и инсулина исследуемые показатели не отличались от контроля.

Выводы. При экспериментальном стрептозотоцин-индуцированном диабете отмечаются существенные нарушения со стороны липидного бислоя мембран митохондрий гепатоцитов, которые более выражены в поверхностном слое мембраны. Применение ниацин-оксиэтилиден-дифосфонато-германата (МИГУ-4) устраняет диабет-провоцированные изменения липидного бислоя мембран и увеличивает корригирующий эффект инсулина.

Ключевые слова: экспериментальный диабет, производные никотиновой кислоты и германия, липидный бислой мембраны митохондрий, гепатоциты, флуоресценция.



THE STATE OF MITOCHONDRIA MEMBRANE OF RAT HEPATOCYTES IN EXPERIMENTAL DIABETES AND PHARMACOLOGICAL TREATMENT

The Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine

Diabetes is widely spread among people of active age and is characterized by the development of severe complications which made patients invalid. That is why it is extremely need to work out new approaches to prophylaxis and treatment of those complications. Experimental streptozotocin-induced diabetes is used for the investigations of glucosotoxic effects along with the screening of anti-diabetes pharmacons.

Aim of the research was confined to the investigations of the hepatocytes membrane state under conditions of experimental diabetes and its treatment with derivatives of oxietilyden-diphosphonate — germanate $(\text{NiCH})_2 [\text{Ge}(\text{OH})_2 (\text{Oedph})]$. H_2O (MIGU-4) with molar mass of 593 G/mol.

Material and methods of investigation. Exeprimental diabetes was modeled via i. p. streptozotocin (STZ) ("Sigma Aldrich ru", 50 mg/kg) administration. MIGU-4 was adiministered in a dosage of 25.0 mg/kg, i. p. Next fluorescence zonds have been explored: universal one — 1 — anilinenaphtaline — 8-sulphonate (1,8-ANS), which bears electronegativity and is diving only at the depth of superficial layer of lipids; hydrophobic one — N — phenyl-1-naphtalamine (1-PNA), which contains sulphate groups and is able to dive deeply into lipid bilayer (up to 8 Å from three methylaminogroups of phospholipids). The next indices have been measured: fluorescence intensity (F_{mol}), specific number of zonds binding (N), constant of binding (K_b) as well as dissociation constant (K_d) of zonds. Membranes were got via liver homogenates centrifugation, with the ourity checking via light microscropy. The fluorescence was verified with spectrophotometer "Opton" (Germany) at the next wave lengths: 360 and 480 nm for ANS; 350 and 420 nm for 1-PNA.

Results of invetsigation. The level of glucose in blood was (15.14 ± 0.83) ; (14.02 ± 0.76) , and (10.25 ± 0.39) mmol/L in two weeks, one, and three months from the moment of MIGU-4 administration correspondently. The level of glucose in insulin — treated rats at analogous time of observation was (10.37 ± 0.95) ; (8.17 ± 0.64) and (7.89 ± 0.39) mmol/L correspondently. In STZ-diabetes F_{mol} of 1,8-ANS zond was reduced in more eight times when compared with the control. At the same time K_b and N increased five times while the constant of dissociation (K_d) decreased by more than four times. In STZ diabetes the F_{mol} of 1-PNA zond was reduced by 61.2%, while N raised more than two times pertained to the control data. MIGU-4 administration induced pronounced correction of listed deteriorations, while those ones continue kept differences when compared with control data. The combined usage of MIGU-4 and insulin investigated indices were not different from control ones.

Conclusions. The experimental STZ-induced diabetes is characterized by substantial deterioration of morphofunctional state of lipid mitochondria membrane, which are more pronounced oin the superficial layer of lipids. The usage of niacin — oxietilyden-diphosphonate-germanate $(\text{NiCH})_2 [\text{Ge}(\text{OH})_2 (\text{Oedph})]$. H_2O (MIGU-4) ameliorated the diabetes-induced changes of lipid bilayer and increased the therapeutic effect of insuline.

Key words: experimental diabetes, niacin and germanium derivatives, mitochondria membrane lipid bilayer, hepatocytes, fluorescence.

Вступ

Захворюваність на цукровий діабет (ЦД) сьогодні є величезною соціальною та медичною проблемою [1] у зв'язку з розвитком ускладнень, перше місце серед яких посідають судинні, а саме — ангіопатії. Діабетичні ангіопатії уражають артерії великого та середнього калібру (макроангіопатії), артеріоли, венули та капіляри (мікроангіопатії) [2]. Доведено, що основними механізмами розвитку діабетичних ангіопатій є імунні, метаболічні, гемореологічні, нейродегенеративні, запальні тощо. Не викликає сумніву, що детермінуючий фактор цього процесу — порушення обміну вуглеводів у організмі [3], що проявляється гіперглікемією та, як наслідок, — глю-

козотоксичністю. При цьому відбувається активація гексоамінового шляху утилізації глюкози, зростання активності альдозоредуктази з накопиченням в організмі фруктози та сорбітолу, утворення кінцевих продуктів неферментативного глікозилювання, протеїнкінази C, посилення перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) з залученням механізмів карбонільного, нітрозативного стресу і зменшенням антиоксидантного потенціалу тканин [4–6].

З другого боку, досить добре відомий механізм дії інсуліну. Як гормон він зв'язується зі своїм рецептором, який складається з двох ланцюгів — альфа та бета. Альфа-ланцюги розміщуються на поверхні мембрани (фосфоліпідного бішару), а бета-ланцюги теж починають-

ся над мембраною, проте вони проходять через усю її товщину, а значна частина їх бере участь у формуванні цитоплазматичного домену. Альфа та бета-ланцюги пов'язані між собою дисульфідними зв'язками. Інсулін в організмі зв'язується безпосередньо з альфа-ланцюгами, а конформаційні зміни, які виникають при цьому в альфа-ланцюгах, передаються на бета-ланцюги, останні, у свою чергу, фосфорилують один одного за рахунок фосфорної кислоти, яка вивільняється при каскадних реакціях АТФ. У подальшому каскад реакцій передається на рецептор інсуліну за допомогою фосфатидінозитол-3-кінази. У результаті цього цитоплазматичний домен фосфорилується та набуває тирок-



син-кіназної активності, тобто стає ферментом, який здатний фосфорилувати той чи інший поліпептид з п'яти так званих субстратів рецепторів інсуліну (IRS), які теж стають хімічно активними.

Каскад сигналів від IRS спрямовується в двох головних напрямках: до ядра клітини та інсулінозалежного транспортера глюкози — глюко-транспортера (ГЛУТ). Останній також активується шляхом фосфорилування та переміщується на мембрану інсулінозалежної клітини. Це відкриває глюкозі шлях до проникнення в середину клітини [7]. Отже, глюкоза може надходити в клітину тільки через вбудований у мембрану та активований ГЛУТ.

Очевидно, що від кількості та ступеня активності ГЛУТ залежить проникнення глюкози в клітини та, відповідно, зменшення її концентрації в крові. Відома значна частина (до 15) ГЛУТ, що, як й інші білки, кодуються відповідним геном. Усі вони схожі між собою за основною функцією та відрізняються тим, що використовуються різними клітинами (м'язовими, жировими тощо). Існують також інсулінозалежні ГЛУТ (відомий єдиний тип ГЛУТ-4) та інсулінонезалежні (усі інші). ГЛУТ-4 знаходиться виключно у трьох типах клітин: жирових, м'язових і клітинах міокарда, які є основними споживачами глюкози. Тому наявність різних дефектів ГЛУТ-4 призводить до гіперглікемії і, як наслідок, до глюкозотоксичності. Очевидним є і те, що функціональна активність IRS та ГЛУТ повністю залежить від морфофункціонального стану мембран, кількісної та якісної характеристики їх фосфоліпідів.

Виходячи з викладеного, першочерговим завданням сучасної діабетології є вивчення патогенетичних причин розвитку інсулінорезистентності та пошук так званих факторів то-

лерантності глюкози (GTF). На роль цих факторів претендує значна кількість біологічно активних речовин: нікотинава та глутамінова кислоти, цистеїн і гліцин та ін. Останнім часом широко вивчається роль тривалентного хрому (Cr⁺⁺⁺) в обміні вуглеводів у організмі тварин і людини [8]. Виходячи з його біологічної активності, можна також передбачити, що германій спроможний активувати кіназу активність рецептора інсуліну. Як відомо, германію притаманні унікальні біологічні властивості, а саме: сполуки германію модулюють імунну відповідь організму; зменшують поріг мутагенності та генотоксичності різних речовин і факторів; мають антиоксидантні, антигіпоксичні та гепатопротекторні властивості; гіпотензивний, протизапальний та анальгезуючий ефект; стимулюють гемопоез і запобігають утворенню амілоїдних білків [9].

Протягом останніх років у нашій лабораторії вивчається фармакологічна активність різних похідних германію з біолігандами. Однією з таких біологічно активних сполук є ніацинооксіетиліден-дифосфонато-германат (NiCH)₂ [Ge(OH)₂ (Oedph)]. H₂O — MІГУ-4 з молярною масою 593 Г/моль. Фармакологічні дослідження показали, що MІГУ-4 посилює окиснювальне фосфорилування, тканинне дихання та їх спряження у мітохондріях, що, в свою чергу, запобігає зменшенню синтезу макроергічних фосфатів, дискоординації активності мітохондріальних АТФ-аз і, врешті-решт, пошкодженню мембран мітохондрій. Ці фармакологічні властивості MІГУ-4 призводять до нормалізації вмісту фосфоліпідів мембран мітохондрій та їх окремих фракцій, пригнічення ПОЛ та стимуляції як ферментативних, так і неферментативних складових антирадикального захисту [10].

Виходячи з викладеного, **метою** роботи було вивчення

стану мембран мітохондрій печінки при експериментальному цукровому діабеті та його корекції похідними оксіетилідендифосфонато-германату з нікотинавою кислотою (MІГУ-4).

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проведено в умовах хронічного експерименту на щурах-самцях лінії Вістар масою від 170 до 320 г. Тварин утримували за стандартних умов експериментально-біологічної клініки ОНМедУ [11]. Дослідження було виконано відповідно до вимог GLP та комісії з біоетики ОНМедУ (протокол № 84 від 10 жовтня 2008 р.). Експериментальний ЦД моделювали внутрішньоочеревинним (в/очер) застосуванням стрептозотоцину (СТЗ) ("Sigma Aldrich ru") натщесерце дозою 50 мг/кг, який попередньо розчиняли у буферному натрієво-цитратному розчині з рН 4,5 [12]. Визначення вмісту глюкози в крові, яку отримували із хвостової вени щурів, проводили в один і той же час (09.00), починаючи з другого тижня спостереження [13]. Ця серія експериментів була проведена на 50 щурах, поділених на п'ять груп по 10 тварин у кожній. Для лікування використовували препарат антрапід НМ ("Novo Nordiks A/S", Данія), MІГУ-4, синтезований на кафедрі загальної хімії і полімерів Одеського національного університету ім. І. І. Мечникова. Біологічно активну речовину (БАР) вводили в/очер дозою ЕД₅₀, яка становила 25,0 мг/кг маси.

Вивчення морфофункціонального стану біомембран мітохондрій печінки проводили так. Структурну основу будь-якої, у тому числі мітохондріальної мембрани, становить фосфоліпідний бімолекулярний шар із вбудованими в нього молекулами білка, які знаходяться як на поверхні, так і глибоко занурені всередину бішару. Саме він виконує в мембрані



функцію бар'єру, матриці для маркерних ферментів, рецепторів та інших ліпідів [14]. Одним з найефективніших методів біофізики в дослідженні цього бішару є флуоресцентне зондування. При опроміненні молекули мембрани ультрафіолетовими променями мембрани їх поглинають і переходять з незбудливого в збуджений стан, який реєструється приладами. Оскільки самі ліпіди не флуоресціюють, для вивчення бішару в нього вводять флуоресцентні зонди (ФЗ). Зонд — це невелика молекула, яка реагує на зміни в мікрооточенні. На цей час відомо близько 50 ФЗ. Вони підрозділяються на універсальні (реагують на різну перебудову мембрани) та спеціалізовані (реагують на зміни одного фізичного параметра мембрани). У нашому дослідженні використовували два ФЗ: універсальний — 1-анілінонафталін-8-сульфонат (1,8-АНС), який несе негативний заряд, унаслідок чого не може глибоко занурюватися у ліпідний бішар й розміщується на його поверхні; гідрофобний — N-феніл-1-нафталамін

(1-ФНА), який не має сульфогрупи, тому занурюється у мембрану глибше, ніж АНС (на відстань 8 Å від триметиламіногрупи фосфоліпиду). За допомогою даних зондів вивчались такі показники: інтенсивність флуоресценції (F_{mol}), питома кількість центрів зв'язування зондів (N), константа зв'язування (K_b) і дисоціації зонда (K_d). Виділення мембран мітохондрій проводили за допомогою центрифугування, чистота виділення контролювалась за допомогою мікроскопа. Флуоресценцію збуджували та реєстрували за допомогою спектрофотометра "Opton" (Німеччина) при довжині хвилі для ФЗ АНС 360 і 480 нм; для ФНА — 350–420 нм, щільно на 1,6 [15].

Результати дослідження обробляли за допомогою методу ANOVA і статистичного тесту Newman-Keuls.

Результати дослідження та їх обговорення

Виходячи з того, що основним ушкоджувальним фактором при ЦД є надмірний рівень глюкози в організмі, і у крові в

першу чергу, спочатку ми дослідили динаміку рівня глюкози в крові щурів при моделюванні експериментального стрептозотоцинового діабету в різні проміжки часу. Дослідження показали, що рівень цукру в крові інтактних тварин протягом 6 міс. дослідження суттєво не змінювався і в середньому становив 5,82 (5,45–6,12) ммоль/л. Це значення було взято за основу при подальшому дослідженні експериментального ЦД. Уже через 2 тиж. після введення СТЗ рівень цукру в крові щурів підвищився у 2,5 рази: (14,53±1,12) ммоль/л щодо початку експерименту — (5,75±0,43) ммоль/л та продовжував зростати і на другому місяці дослідження досяг найбільшого значення — (19,33±0,75) ммоль/л (табл. 1). Майже на такому ж рівні він залишався протягом усіх 6 міс. дослідження, що свідчить про надійність моделі ЦД, викликаного СТЗ. Отримавши валідну модель ЦД, у подальшому ми дослідили вплив інсуліну на динаміку вмісту глюкози в крові щурів у ті ж самі проміжки часу. Враховуючи незначні ко-

Таблиця 1

Динаміка рівня глюкози у щурів при експериментальному діабеті та його лікуванні, ммоль/л

Вид дослідження	Термін спостереження					
	До початку експерименту	2 тиж.	1 міс.	2 міс.	3 міс.	6 міс.
Контроль, М±m	5,75±0,43	6,05±0,65	5,45±0,30	5,94±0,47	6,12±0,40	5,60±0,72
Експериментальний цукровий діабет (ЦД) без лікування, М±m %	5,75±0,43	14,53±1,12 +252,7* +240,2#	18,64±0,95 +324,2* +342,0#	19,33±0,75 +336,2* +325,4#	18,72±1,10 +325,6* +305,9#	17,95±0,82 +312,2* +320,5#
ЦД + інсулін, М±m %	17,27±0,89	10,37±0,95 -60,0* +171,4#	8,17±0,64 -47,3* -149,9#	6,75±0,59 -39,1* +113,6	7,89±0,72 -45,7* +128,9#	9,15±0,39 -53,0* +163,4#
ЦД + МІГУ-4, М±m %	18,51±1,18	15,14±0,83 -81,1* +250,2#	14,02±0,76 -75,7* +257,2#	12,10±0,68 -65,4* +203,7#	10,15±0,39 -54,8* +165,8#	8,90±0,41 -48,1* +158,9#
ЦД + інсулін + МІГУ-4, М±m %	16,94±0,77	9,56±0,51 -56,4* +158,0#	6,45±0,33 -38,1* +118,3#	4,96±0,21 -29,3* -83,5#	5,27±0,26 -31,1* -86,1#	5,10±0,19 -30,1* -91,1#

Примітка. * — $p < 0,05$ порівняно з показником до початку експерименту; # — $p < 0,05$ порівняно з контролем.



ливання рівня цукру в крові тварин, відсутність можливості визначення толерантності до глюкози та у зв'язку з цим — відсутність точного розрахунку необхідної для введення дози інсуліну, препарат вводили підшкірно від 1 до 3 од. п'ять разів на тиждень.

Результати дослідження свідчать, що інсулін, введений на тлі ЦД, значно зменшує вміст цукру в крові, проте не повертає його до контрольних величин. Збільшення дози інсуліну сприяє зменшенню рівня цукру в крові, але цей рівень є нестабільним, водночас різко змінюється поведінка тварин. Вони стають млявими, повільно рухаються, шерстний покрив кострубатий та зволожений, тобто проявляються явні ознаки гіпоглікемії. Тому в подальшому ми використовували з лікувальною метою саме ці дози інсуліну. Через 2 тиж. після початку лікування інсуліном рівень цукру зменшився на 40,0 % ($p < 0,05$) і залишався удвічі меншим протягом усього періоду дослідження. На третьому місяці розвитку ЦД та введенні інсуліну рівень цукру становив $(7,89 \pm 0,72)$ ммоль/л проти $(17,27 \pm 0,89)$ ммоль/л на початку лікування.

За такою схемою ми вводили досліджувану БАР — МІГУ-4. Результати свідчать, що введення МІГУ-4 тваринам з ЦД також супроводжується зменшенням вмісту цукру в крові, хоча він був у 1,5 рази меншим, ніж при введенні інсуліну. Через 2 тиж. після введення МІГУ-4 рівень цукру в крові становив $(15,14 \pm 0,83)$ ммоль/л, через місяць — $(14,02 \pm 0,76)$ ммоль/л, а через 3 міс. — $(10,25 \pm 0,39)$ ммоль/л порівняно з введенням інсуліну, відповідно $(10,37 \pm 0,95)$; $(8,17 \pm 0,64)$ і $(7,89 \pm 0,39)$ ммоль/л (див. табл. 1). Отже, БАР МІГУ-4 діяла однонаправлено з інсуліном — знижувала рівень цукру, проте, порівняно з інсуліном, виразність цього ефекту була у 1,5 рази меншою.

У зв'язку з тим, що МІГУ-4 викликав зниження цукру в крові експериментальних тварин з ЦД, було важливим дослідити ефективність поєднаного введення МІГУ-4 та інсуліну. Отримані результати свідчать, що поєднане їх введення приводило до потенційованих ефектів. Уже через 2 тиж. після введення двох лікарських засобів вміст цукру в крові щурів вірогідно зменшився майже удвічі — $(9,56 \pm 0,51)$ ммоль/л проти $(16,94 \pm 0,77)$ ммоль/л ($p < 0,05$), починаючи з першого місяця спостереження і до шостого, — практично не відрізнявся від контрольних величин. Ці спостереження, з одного боку, свідчать про те, що введення інсуліну разом з БАР — похідним германію та нікотинової кислоти майже нормалізує рівень цукру в крові тварин, а з другого — ставить перед нами низку важливих запитань. Перш за все, необхідно з'ясувати, за рахунок яких механізмів знижується рівень цукру? У цьому напрямку можна припустити, що фармакологічний ефект реалізується так: стимулюються бета-клітини підшлункової залози, зменшується толерантність до глюкози за рахунок впливу на IRS, нормалізується морфофункціональний стан мембран клітин і, як наслідок, функція глікотранспортерів. Усі ці припущення потребують подальшого вивчення та уточнення.

Подальші дослідження були сконцентровані на вивченні мембран мітохондрій печінки, які поряд з мембранами еритроцитів є стандартом дослідження в мембранології. Молекула АНС, завдяки наявності зарядженої сульфогрупи ($pK_a = 1$), не може глибоко зануритися в ліпідний бішар, тому розміщується на поверхні так, що одна поверхня фенольного кільця примикає до гліцеринових ділянок фосфоліпиду, а друга контактує з водою. Молекула ФНА не має сульфогрупи, і тому може бути зану-

рена у мембрану глибше, ніж АНС. Вона розміщується на відстані більше ніж 8 Å від триметиламіногрупи фосфоліпиду. Враховуючи недостатню електронну щільність атома азоту і можливість утворення водневих зв'язків, переважним уявляється розташування молекули ФНА у ділянці карбонільних груп фосфоліпідів. Отже, флуоресценція зондів, що вивчаються, відображає ті зміни в різних зонах мембрани, які виникають під впливом ЦД та його корекції досліджуваними медикаментозними засобами. Це зміни в'язкості, температури, структурних перебудов поверхневих зарядів, трансмембранного потенціалу, концентрації інших молекул — гасників флуоресценції, акцепторів і донаторів енергії збудженого стану тощо.

У наших дослідженнях вивчали стан природних мембран мітохондрій печінки інтактних щурів, який порівнювали з аналогічними даними при ЦД без лікування та при ЦД, який коригувався інсуліном, МІГУ-4. Усього було проведено 9 серій експериментів (9 груп тварин по 7 у кожній), а у кожній групі отримували проби двох паралелей.

Дослідження стану мембран мітохондрій печінки щурів за допомогою ФЗ АНС свідчать, що при ЦД істотно погіршується морфофункціональний стан поверхневих шарів мембран, на що вказує інтегральний показник — сумарна флуоресценція (F_{mol}), яка при сформованому ЦД зменшувалася більше ніж у 8 разів (табл. 2). Наслідком цих змін у поверхневих шарах мембран є істотне збільшення константи зв'язування (K_b — binding) зонда — майже у 5 разів, кількості центрів зв'язування (N) зонда з молекулами — більше ніж у 5 разів та зменшення константи дисоціації ФЗ (K_d — dissociation), як величини зворотної до K_b , — більше ніж у 4 рази. Причому ці зрушення пов-



**Функціональний стан мембран мітохондрій печінки щурів
при експериментальному діабеті та його лікуванні
згідно з флуоресцентним зондуванням універсальним зондом АНС**

Показник	K_b		K_d		N		F_{mol}	
	М-1, абс.	%	М-1, абс.	%	М-1, абс.	%	М-1, абс.	%
Контроль	$1,76 \cdot 10^{-2}$	100,0	67,8	100,0	$1,52 \cdot 10^{-4}$	100,0	$2,31 \cdot 10^6$	100,0
ЦД без лікування (2 тиж. після СТЗ)	$7,94 \cdot 10^{-2}$	451,1***	15,7	23,1***	$7,69 \cdot 10^{-4}$	505,9***	$1,25 \cdot 10^5$	5,4***
ЦД + інсулін (місяць після СТЗ)	$5,44 \cdot 10^{-2}$	309,1***	37,6	55,4***	$5,49 \cdot 10^{-4}$	361,2***	$1,63 \cdot 10^6$	70,8**
ЦД + МІГУ-4 (місяць після СТЗ)	$4,90 \cdot 10^{-2}$	278,1***	41,8	61,6***	$4,96 \cdot 10^{-4}$	326,3***	$1,59 \cdot 10^6$	69,0**
ЦД + інсулін + МІГУ-4 (місяць після СТЗ)	$3,21 \cdot 10^{-2}$	182,4***	54,7	80,7*	$2,35 \cdot 10^{-4}$	154,6**	$2,01 \cdot 10^6$	87,2

Примітка. У табл. 2 і 3: * — порівняно з контролем значення коефіцієнта кореляції, причому: * — 0,30 — слабкий зв'язок; ** — 0,30–0,69 — середній ступінь щільності зв'язку; *** — 0,70 і вище — високий ступінь кореляційного зв'язку.

ністю збігалися зі змінами молярної флуоресценції (F_{mol}).

Корекція експериментального ЦД як інсуліном, БАР МІГУ-4, так і при їх поєднаному введенні суттєво нормалізувала сумарну флуоресценцію як інтегральний показник міжмолекулярних зв'язків мембран. Різниця F_{mol} між контролем та введенням інсуліну і МІГУ-4 була не вірогідною. Вірогідно зменшувалась і кількість центрів зв'язування ФЗ із мембранами, проте вона була далекою від контролю (у 1,5 рази більшою). Аналогічно зменшувалась і константа зв'язування ФЗ. Усе це свідчить про те, що ЦД жорстко порушує

морфофункціональний стан мембран гепатоцитів щурів. Введення інсуліну, нової БАР МІГУ-4, а особливо їх комбінації, приводить до суттєвої нормалізації стану мембран.

Вивчення більш глибоких шарів мембран за допомогою ФЗ ФНА показало, що вони суттєво змінюються при ЦД, проте не так різко, як поверхневі (табл. 3). Сумарна флуоресценція зменшувалась при ЦД, але на 61,2 %, тобто більш глибокі шари мембран пошкоджувались відносно менше, ніж поверхневі. Відповідно і нормалізація даного біофізичного показника була більш вираженою, а при поєднаному

введенні інсуліну та МІГУ-4 поверталась до контрольних величин. Кількість центрів зв'язування (N) при формуванні ЦД зростала більше ніж удвічі, що свідчить про суттєве «розрідження» фосфоліпідного бішару.

Застосування інсуліну і МІГУ-4 суттєво не вплигло на зміну центрів зв'язування в глибоких шарах бішару і тільки їх комбіноване введення відновляло цей показник. Аналогічні зміни спостерігались щодо K_b та K_d ФЗ ФНА.

Таким чином, отримані результати свідчать, що у глибоких шарах мембран при ЦД теж порушуються міжмолеку-

Таблиця 3

**Функціональний стан мембран мітохондрій печінки щурів
при експериментальному діабеті та його лікуванні
згідно з флуоресцентним зондуванням гідрофобним зондом ФНА**

Показник	K_b		K_d		N		F_{mol}	
	М-1, абс.	%	М-1, абс.	%	М-1, абс.	%	М-1, абс.	%
Контроль	$5,34 \cdot 10^4$	100,0	$2,67 \cdot 10^{-5}$	100,0	$6,75 \cdot 10^{-4}$	100,0	$3,56 \cdot 10^5$	100,0
ЦД без лікування (2 тиж. після СТЗ)	$14,08 \cdot 10^4$	263,7***	$1,02 \cdot 10^{-5}$	38,2***	$14,45 \cdot 10^{-4}$	214,1***	$1,38 \cdot 10^5$	38,8***
ЦД + інсулін (місяць після СТЗ)	$9,49 \cdot 10^4$	177,7***	$1,83 \cdot 10^{-5}$	68,5**	$11,52 \cdot 10^{-4}$	170,7***	$2,30 \cdot 10^5$	64,6***
ЦД + МІГУ-4 (місяць після СТЗ)	$8,95 \cdot 10^4$	167,6***	$2,11 \cdot 10^{-5}$	79,0*	$12,13 \cdot 10^{-4}$	179,7***	$2,96 \cdot 10^5$	83,1*
ЦД + інсулін + МІГУ-4 (місяць після СТЗ)	$6,76 \cdot 10^4$	126,6*	$2,93 \cdot 10^{-5}$	109,7	$7,48 \cdot 10^{-4}$	110,8	$3,09 \cdot 10^5$	86,8



лярні відношення, але вони набагато менші, ніж у поверхневих шарах. Ці скринінгові дослідження підтверджують, що при ЦД порушується морфофункціональний стан, у першу чергу поверхневих, а потім і глибоких шарів біомембран мітохондрій. Установлено також прямий взаємозв'язок між цими порушеннями та станом гіперглікемії. Очевидно, що вони є прямим наслідком ЦД. Дослідження виявили зміни фосфоліпідного матриксу мембран, проте залишили відкритим питання про причини, які до цього призводять. Результати вивчення цих механізмів будуть опубліковані в наступних роботах.

Висновки

1. Проведені дослідження свідчать про те, що експериментальний стрептозотоциновий діабет у щурів є адекватною моделлю для вивчення його патогенетичних механізмів.

2. У роботі доведено, що рівень глюкози у крові щурів при ЦД можна регулювати введенням інсуліну.

3. Вивчено вплив нової БАР — МІГУ-4 на рівень глюкози в крові щурів з ЦД. Доведено, що МІГУ-4, введений щурам при ЦД суттєво знижує рівень глюкози в крові. Його дія удвічі посилюється при поєднанні з інсуліном.

4. За допомогою ФЗ вивчено морфофункціональний стан мембран мітохондрій печінки щурів при експериментальному ЦД та його корекції інсуліном і новою БАР — МІГУ-4.

5. Результати дослідження, отримані за допомогою ФЗ АНС, свідчать, що при ЦД істотно погіршується морфофункціональний стан поверхневих шарів мембран. F_{mol} (сумарна флуоресценція) зменшується більше ніж у 8 разів. Водночас у 5 разів зростають константа зв'язування ФЗ (K_b) та кількість центрів зв'язування (N) при зменшенні у 4 рази константи

дисоціації (K_d) як величини, оберненої до K_b . Усі ці зміни свідчать про суттєві зрушення морфофункціонального стану поверхневих шарів мембран.

6. Вивчення більш глибоких шарів мембран за допомогою ФЗ ФНА свідчить, що вони теж суттєво змінюються при ЦД, проте не так різко, як поверхневі. Застосування як одного інсуліну, так і МІГУ-4, а особливо їх комбінації, показало можливість значної корекції морфофункціонального стану мембран, їх міжмолекулярних зв'язків та, як наслідок, їх плинності.

7. Важливим подальшим завданням є вивчення патогенетичних механізмів, які приводять до визначених у дослідженні змін.

ЛІТЕРАТУРА

1. *IDF diabetes: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030* / D. R. Whiting, L. Guariguata, C. Weil [et al.] // *Diabetes Res. Clin. Pract.* – 2011. – Vol. 94, N 3. – P. 311–321.

2. *Комісаренко Ю. І.* Рівень вітаміну D у хворих із діабетичною ретинопатією / Ю. І. Комісаренко, Р. Л. Скрипник, О. В. Антоненко // *Ендокринологія*. – 2012. – Т. 17, № 3. – С. 56–58.

3. *Frank R. N.* Diabetic retinopathy / R. N. Frank // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – Vol. 350. – P. 48–58.

4. *Давыдов В. В.* Карбонильный стресс как неспецифический фактор патогенеза (обзор литературы и собственных исследований) / В. В. Давыдов, А. И. Божков // *Журнал НАМН Украины*. – 2014. – Т. 20, № 1. – С. 25–34.

5. *Цисельский Ю. В.* Биохимия глазных осложнений сахарного диабета / Ю. В. Цисельский, А. П. Левицкий // *Офтальмологический журнал*. – 2004. – № 3. – С. 11–16.

6. *The effect of chronic N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) administration on visual evoked potentials and oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats* / Y. Gul Ozkaya, G. Hacıoglu, V. Kucukatay [et al.] // *J. Neurol. Sci.* – 2011. – Vol. 28. – P. 132–141.

7. *Аблаев Н. Р.* Молекулярные механизмы развития сахарного диабета при дефиците витамина D и хрома (обзор современной литературы) / Н. Р. Аблаев, Д. Ж. Батырбаев

ва // *Вестник КазНМУ*. – 2015. – № 3. – С. 186–197.

8. *Celfalu W. T.* Role of chromium in human health and in diabetes / W. T. Celfalu, F. B. Hu // *Diabetes Care*. – 2004. – N 27. – P. 274–275.

9. *Годован В. В.* Фармакологічні властивості нових похідних германієвих солей дифосфонових кислот з біолігандами : дис. на здобуття наук. ступеня д-ра мед. наук / В. В. Годован. – Одеса, 2008. – 452 с.

10. *Годован В. В.* Вплив похідних оксіетилідендифосфонатогерманатів на фосфоліпідний склад мембран при токсичному ураженні печінки / В. В. Годован, В. Й. Кресюн, І. Й. Сейфуліна // *Журнал АМН України*. – 2008. – Т. 14, № 1. – С. 63–73.

11. *Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to mice and higher mammals* / R. Robinson, V. A. Barathi, S. S. Chaurasia [et al.] // *Dis. Model Mech.* – 2012. – Vol. 5, N 4. – P. 444–456.

12. *Kowluru R. A.* Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental galactosemia. VII. Effect of long-term administration of antioxidants on the development of retinopathy / R. A. Kowluru, J. Tang, T. S. Kern // *Diabetes*. – 2001. – Vol. 50. – P. 1938–1942.

13. *Retinal microaneurysm counts and 10-year progression of diabetic retinopathy* / R. Klein, S. M. Meuer, S. M. Moss, B. E. Klein // *Arch. Ophthalmol.* – 1995. – Vol. 113. – P. 1386–1391.

14. *Ивков В. Г.* Динамическая структура липидного бислоя / В. Г. Ивков, Г. Н. Берестовский. – М.: Наука, 1981. – 296 с.

15. *Кресюн Н. В.* Особливості морфофункціонального стану еритроцитів у хворих з простою формою діабетичної ретинопатії / Н. В. Кресюн // *Одеський медичний журнал*. – 2003. – № 6 (80). – С. 84–87.

REFERENCES

1. Whiting D.R., Guariguata L., Weil C. et al. IDF diabetes: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract* 2011; 94 (3): 311-321.

2. Komisarenko Yu.I., Skripnik R.L., Antonenko O.V. The level of vitamin D in patients with diabetes retinopathy. *Endocrinology* 2012; 17 (3): 56-58.

3. Frank R.N. Diabetic retinopathy. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350: 48-58.

4. Davydov V.V., Bozhkov A.I. Carbonile stress as unspecific factor of pathogenesis (review of literature and results of investigations). *Journal of NAMDS of Ukraine* 2014; 20 (1): 25-34.



5. Tsyselskiy Yu.V., Levitskiy A.P. The biochemistry of ophthalmological diabetes complications. *Ophthalmological Journal* 2004; 3: 11-16.

6. Gul Ozkaya Y., Hacıoglu G., Kucukatay V. et al. The effect of chronic N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) administration on visual evoked potentials and oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats. *J. Neurol. Sci.* 2011; 28: 132-141.

7. Ablaev N.R., Batyrbaev D.J. Molecular mechanisms of diabetes development under conditions of vitamin D deficit and chromium supplying (literature review). *Proceedings of Kazan Med. Univ.* 2015; 3: 186-197.

8. Celfalu W.T., Hu F.B. Role of chromium in human health and in diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 274-275.

9. Godovan V.V. Pharmacological properties of new derivatives of germanium and diphosphonate with bioligands. Thesis on gaining D. Sci. degree in medicine. Odesa, 2008. 452 p.

10. Godovan V.V., Kresyun V.I., Сейфуліна І.І. The influence of the niacin — oxietilydon — diphosphonate — germanate derivatives upon membrane phospholipid state in conditions of toxic liver damage. *Journal of NAMS of Ukraine* 2008; 14 (1): 63-73.

11. Robinson R., Barathi V.A., Chaurasia S.S. et al. Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to mice and higher mammals. *Dis. Model Mech.* 2012; 5 (4): 444-456.

12. Kowluru R.A., Tang J., Kern T.S. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental ga-

lactosemia. VII. Effect of long-term administration of antioxidants on the development of retinopathy. *Diabetes* 2001; 50: 1938-1942.

13. Klein R., Meuer S.M., Moss S.M., Klein B.E. Retinal microaneurysm counts and 10-year progression of diabetic retinopathy. *Arch. Ophthalmol.* 1995; 113: 1386-1391.

14. Ivkov V.G., Berestovsky G.N. The dynamic structure of lipid bilayer. Moscow, Science, 1981. 296 p.

15. Kresyun N.V. The characteristics of morpho-functional erythrocytes state in patients with simple diabetes retinopathy. *Odes'kyi Medychnyy Zhurnal* 2003; 6 (80): 84-87.

Надійшла 14.02.2017

Рецензент д-р мед. наук,
проф. В. В. Годован

Передплачуйте
і читайте



ОДЕСЬКИЙ МЕДИЧНИЙ ЖУРНАЛ

Передплата приймається у будь-якому
передплатному пункті

Передплатний індекс 48717

У випусках журналу:

- ◆ Теорія і експеримент
- ◆ Клінічна практика
- ◆ Профілактика, реабілітація, валеологія
- ◆ Новітні технології
- ◆ Огляди, рецензії, дискусії

