

Summary

INVESTIGATION OF PRESENCE AND LOCALIZATION OF E-CADHERIN EPITHELIAL ADHESION FACTOR IN CARDIAC MYXOMA CELLS

Shaposhnyk L.A., Kuzenko Ye.V., Vytovskiy R.M.

Key words: histogenesis of tumors, cardiac myxoma, E-cadherin.

Histogenesis of cardiac myxoma is little unknown at present. There have been existed mesenchymal and endothelial theories. Morphological features of tumors confirm each of them. In myxoma cells there are markers of mesenchymal origin as vimentin, FVII-R-Ag, CD31, CD34, alkaline-phosphatase. This paper studies the presence and location of E-cadherin – a marker of epithelial tissues in myxoma cells. The presence of the E-cadherin is shown in most of the tumor cells by the immunohistochemical method, which indicates the cardiac myxomas might originate from epithelial tissue

УДК 616.379-008.64-085.36

Шумейко О.Г.

ВИКОРИСТАННЯ ЕКСТРАКТУ З МІДІЇ ЧОРНОМОРСЬКОЇ ДЛЯ КОМПЛЕКСНОГО ЛІКУВАННЯ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ НА ТЛІ МЕТАБОЛІЧНОГО АЦИДОЗУ

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія» м. Полтава

Вивчалися дихальні показники мітохондрій печінки щурів та гомогенатів підшлункової залози щурів з модельованим цукровим діабетом на тлі метаболічного ацидозу при використанні екстракту з мідії чорноморської. Визначено збільшення швидкості дихання фосфорелюючих мітохондрій і поліпшення дихального контролю. Також при використанні екстракту з мідії чорноморської достовірно знижувався рівень гідроперекисів в мітохондріях печінки щурів з модельованим цукровим діабетом 2 типу.

Ключові слова: метаболічний ацидоз, цукровий діабет, мітохондрії.

Дана робота є фрагментом наукової теми «Пошук біологічно активних речовин, що впливають на основні патогенетичні ланки цукрового діабету, серед сполук з гуанідиновим та тіазолідиновим фрагментами», № держреєстрації 0107U000424.

Вступ

В основі розвитку метаболічного ацидозу беруть участь два основних механізми - навантаження іонами Н (при надмірному надходженні кислот) і втрата бікарбонатів або використання НСО₃ як буфера для нейтралізації кислот.

Підвищене надходження іонів Н в організм при недостатній компенсації призводить до розвитку двох варіантів метаболічного ацидозу - гіперхлоремічного і ацидозу з високим аніонним дефіцитом.

Гіперхлоремічний ацидоз розвивається в ситуаціях, коли джерелом збільшеного надходження іонів Н в організм виступає соляна кислота (HCl). В результаті позаклітинні бікарбонати заміщаються хлоридами. У цих випадках підвищення в крові хлоридів вище нормальних значень викликає рівнозначне зниження концентрації бікарбонатів. Значення аніонного проміжку не змінюються і відповідають нормальним.

Ацидоз з високим аніонним дефіцитом розвивається, коли причиною збільшеного надходження іонів Н в організм виступають інші кислоти (молочна при лактат-ацидозі, кетонові кислоти при цукровому діабеті та голодуванні та ін.) Ці органічні кислоти заміщують бікарбонат, що призводить до зростання аніонного проміжку.

Клінічні й експериментальні дані засвідчують важливу роль метаболічного ацидозу у розвитку цукрового діабету і його ускладнень [1,2]. Так, показано активацію продукції активних метаболітів

літів оксигену, що є маркерами метаболічного ацидозу, насамперед пов'язану з особливостями роботи мітохондрій, у різних тканинах при діабеті [3,4]. Відомо, що вільнорадикальне ушкодження біополімерів при ацидозі здатне призводити до утворення імуногенних форм білків, мутацій у ДНК і посилення аутоімунних процесів, а пошкодження біомембран ускладнює гормонорецепторну взаємодію на рівні клітин-мішеней інсуліну, посилюючи інсулінорезистентність [5]. Крім того доведено, що за умов розвитку метаболічного ацидозу відбувається руйнування внутрішньої мітохондріальної мембрани активними метаболітами оксигену, вихід з неї цитохрому С, фрагментація мітохондрій та індукція апоптозу [6]. Тому особливу увагу натеper приділяють пошуку таких фармакологічних засобів, що здатні знижувати продукцію активних метаболітів оксигену саме у мітохондріях.

Мітохондріальні структури надзвичайно чутливі до оксидативних ушкоджень, що призводять до зниження синтезу АТФ, порушення гомеостазу кальцію, проникності мітохондріальної мембрани, що наближує клітину до некрозу або апоптозу. Таким чином, посилення роботи дихального ланцюга мітохондрій, яке провокує метаболічний ацидоз та оксидативний стрес, в остаточному підсумку може призводити до порушення функцій цих органел, їх руйнування та загибелі клітини.

У зв'язку з вищевикладеним, увагу привернув екстракт із мідії чорноморської (*Mytilus galloprovincialis* Lam.). Переваги даного екстрак-

ту над природними препаратами, які використовуються для терапії цукрового діабету на тлі метаболічного ацидозу, і мають аналогічні, у тому числі, антиоксидантні та цукрознижуючі ефекти, полягають у тому, що він поєднує в собі позитивні якості, властиві різним препаратом. Це - антиоксидантна дія, низька токсичність, антигіперглікемічний та виразний гепатопротекторний ефекти, наявність у складі біологічно активних поліненасичених жирних кислот (попередники компонентів імунного захисту), збалансованого спектра субстратів (повний набір амінокислот, включаючи незамінні) для синтезу клітинних структур, пептидів і білків, у тому числі, антиоксидантних ферментів і низькомолекулярних антиоксидантів, зокрема, глутатіону та убіхінону. Все це дозволяє припустити, що екстракт буде ефективним для терапії цукрового діабету, викликаного метаболічним ацидозом, у плані збереження цілісності інсулінпродуруючого апарата, а також для корекції гіперглікемії, інсуліно-резистентності та інсулінової недостатності.

Мета роботи

Обґрунтування розробки нових лікарських засобів з комплексними властивостями, які сприяють підвищенню ефективності комплексного лікування цукрового діабету на тлі метаболічного ацидозу.

Об'єкт і методи дослідження

Дослідження функціональної активності мітохондрій за показниками поглинання кисню в різних метаболічних станах – при фосфорилуванні (V_3) і за його відсутності (V_4) вказує на наявність дефектів електронтранспортних ланцюгів внутрішньої мембрани мітохондрій, що може призводити до розвитку метаболічного ацидозу та посиленого вироблення активних метаболітів кисню і наступної активації перекисного окислення ліпідів. Оскільки вироблення супероксидного аніона відбувається на ділянках функціонування I і II комплексів дихального ланцюга мітохондрій, доцільно вимірювати функціональні характеристики органел при додаванні в якості субстрату реакції дихання мітохондрій у середо-

вище глутамат+малат (I комплекс), або сукцинат (II комплекс).

Нами був проведений порівняльний аналіз функціональної активності мітохондрій печінки щурів за умов абсолютної та відносної інсулінової недостатності, що викликали в експерименті за допомогою високодозового стрептозотоцинового діабету та моделі цукрового діабету 2 типу, відповідно.

Результати досліджень та їх обговорення

Як видно з даних таблиці 1, швидкість дихання нефосфорилуючих мітохондрій (V_4 , із субстратом глутамат+малат) печінки щурів з абсолютною інсуліновою недостатністю однакова в контрольній і дослідних групах, тоді як у фосфорилуючих мітохондрій швидкість (V_3) знижена за ЦД на 30 % ($P < 0,05$). Зниження здатності до фосфорилування АДФ і, відповідно, синтезу АТФ при нормальній швидкості дихальних процесів може бути пов'язане із втратою ефективності електрохімічного потенціалу внутрішньої мембрани мітохондрій. Тобто, у цьому випадку ми спостерігаємо порушення сполучення процесів дихання та фосфорилування. Підтвердженням служить зменшення в групі діабетичних щурів такого показника, як коефіцієнт дихального контролю (ДК) ($P < 0,05$). За умов даної експериментальної моделі за пригнічення синтезу АТФ, імовірно, відповідальний механізм дії стрептозоточина. Проникаючи в клітину за допомогою транспортера глюкози GLUT-2, що має панкреатичну та печінкову локалізацію, стрептозоточин у високих концентраціях викликає АДФ-рибозилування ДНК, наслідки якого більш травматичні для клітини, ніж власно ушкодження ДНК [7]. Результатом процесу може бути конкурентне відволікання АДФ від синтезу АТФ у мітохондріях і НАД⁺ від участі в процесах дихання. За умов абсолютної інсулінової недостатності порушено шляхи регуляції пластичних процесів у печінці, тому надходження додаткових субстратів ззовні є запорукою відновлення балансу метаболітів, що від них залежать [9].

Таблиця 1

Функціональні показники мітохондрій печінки у щурів з високодозовим стрептозотоциновим діабетом за умов перорального введення екстракту з мідій протягом 10 днів, ($\bar{x} \pm S_x$)

Група	n	Швидкість дихання (нмоль О/хв/мг білка)		Дихальний контроль (V_3/V_4)
		V_4	V_3	
Контроль+плацебо	7	12,67±1,24	61,07±5,95	4,68±0,45
Діабет+плацебо	5	12,40±1,01	42,25±4,13	3,35±0,11
Діабет+екстракт із мідій	6	13,17±0,75	74,54±1,58	5,85±0,31

Оскільки до складу екстракту з мідій входить триптофан, який може виступати попередником синтезу нікотинаміду у тварин, це може пояснити спостережений ефект відновлення V_3 .

На відміну від цукрового діабету 1 типу, вільнорадикальні процеси є провідними в патогенезі цукрового діабету 2 типу та його ускладнень у людини. Одним із потужних джерел активних

метаболітів кисню є мітохондрії клітин органів з високим метаболізмом глюкози [8], що запускає замкнуте коло змін, які загрожують клітині апоптозом. У зв'язку з цим корекція мітохондріальних порушень, характерних для патогенезу цукрового діабету 2 типу, є актуальною метою сучасної діабетології.

Для визначення можливості її досягнення ми

дослідили застосування екстракту з мідій, розповсюдженого ефективного антидіабетичного препарату метформіну, а також їх комплексу у щурів з експериментальним цукровим діабетом 2 типу. Застосування метформіну вирішує основне завдання лікування цукрового діабету 2 типу – зменшення інсулінорезистентності та поліпшення глікемічних показників. Разом з тим, були виявлені негативні ефекти метформіна в мітохондріях – порушення роботи Ca^{2+} -пори, збільшення окислювання тіолових груп білків, інгібування роботи I комплексу дихального ланцюга за аналогією з референтним інгібітором циклоспорином А. Однак, роботи останніх років свідчать, що агенти з м'яким роз'єднувальним ефектом сприяють зниженню вироблення активних метаболітів кисню у мітохондріях за умов надлишку в клітині субстратів окислювання (наприклад, глюкози), що має місце у печінці саме за умов цукрового діабету. Тому становило інтерес з'ясувати вплив метформіну на роботу не I, заінгібованого їм, а II комплексу дихального ланцюга за умов експериментального цукрового діабету 2 типу, а також оцінити ефективність екстракту з мідій за даних умов.

Як показали результати досліджень, наведені в таблиці 2, у групі щурів «Діабет+плацебо» V_3 , тобто швидкість дихання за умов фосфорилю-

вання, знижена в порівнянні з контролем ($P<0,03$). Це вказує на часткове роз'єднання процесів дихання та вироблення АТФ, що віддзеркалено в зменшенні дихального контролю, насамперед, з активацією роботи дихального ланцюга мітохондрій внаслідок високої концентрації в клітинах печінки субстратів окислювання – глюкози та жирних кислот. Збільшення при цьому вироблення активних метаболітів кисню призводить до запуску механізмів формування інсулінорезистентності в печінці. Так, активні метаболіти кисню, що утворилися у великій кількості в дихальному ланцюзі мітохондрій, активують роботу різних стрес-залежних протеїн кіназ типу JNK, p38, IKK β . Ці кінази фосфорилують серин субстрату інсулінового рецептора-1. Додатково IKK β активує ядерний фактор κB (NF κB), фактор транскрипції для гена індукцибельної NO-синтази (iNOS), що провокує збільшення вироблення NO (оксида нітрогену). У свою чергу NO здатний нітрозилувати субстрат інсулінового рецептора-1. Такі хімічні зміни призводять до протеосо-залежної деградації пов'язаних з субстратом білкових факторів сигнальної трансдукції інсуліну. Ці ефекти в результаті модулюють інсулінову резистентність не тільки в печінці, але й у жировій тканині та скелетних м'язях [10].

Таблиця 2

Функціональні показники мітохондрій печінки щурів з цукровим діабетом 2 типу за умов перорального введення екстракту із мідій та метформіну протягом 14 днів

Група	n	Швидкість дихання (нмоль O ₂ /хв/мг білка)		Дихальний контроль (V_3/V_4) $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$
		V_4 $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	V_3 $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	
Контроль +плацебо	7	14,96±0,67	57,52±4,80	3,85±0,24
Діабет +плацебо	5	13,28±4,20	30,01±4,47 $P_1<0,03$	2,19±0,12 $P_1<0,03$
Діабет +метформін	6	14,81±0,60	54,60±2,74 $P_2<0,05$	3,70±0,31
Діабет + екстракт із мідій	6	14,24±0,52	76,30±8,31 $P_2<0,003$ $P_3<0,1$	5,38±0,77 $P_2<0,003$
Діабет +метформін +екстракт із мідій	7	13,23±0,56	73,15±2,27 $P_1<0,05$ $P_2<0,003$ $P_3<0,003$	5,54±0,36 $P_1<0,05$ $P_2<0,003$ $P_3<0,006$

Примітки: 1. P_1 – вірогідність змін порівняно з групою "Контроль+плацебо".

2. P_2 – вірогідність змін порівняно з групою "Діабет+плацебо".

3. P_3 – вірогідність змін порівняно з групою "Діабет+метформін".

Таким чином, за умов формування як абсолютної, так і відносної інсулінової недостатності спостерігається порушення функціональної активності мітохондрій печінки. Результати експериментів з моделювання високодозового стрептозотозинного діабету щодо аналізу енергетичних характеристик мітохондрій печінки можна екстраполювати на клінічний плин цукрового діабету 1 типу у людини. За цих умов терапевтичний вплив досліджуваного екстракту свідчив про його виразний відновлюючий та протигепатотоксичний вплив.

Картина подій, які відбуваються за умов моделювання цукрового діабету 2 типу, цілком

відповідає такій у людини - одним з перших внесок у розвиток даної патології вносить саме вільнорадикальна ланка. У зв'язку із цим, отримані нами дані ефективності застосування екстракту й, більшою мірою, комплексу метформіну та екстракту з мідій за ЦД 2 типу можна рекомендувати для подальших клінічних досліджень.

Таким чином, отримані в модельованому експерименті на тваринах результати дозволяють зробити наступні висновки:

1. Клінічні й експериментальні дані засвідчують важливу роль метаболічного ацидозу у розвитку цукрового діабету і його ускладнень.

2. Покращення дихальних показників мітохо-

ндрій печінки щурів та гомогенатів підшлункової залози щурів з модельованим цукровим діабетом на тлі метаболічного ацидозу при використанні екстракту з мідії чорноморської.

3. За умов формування як абсолютної, так і відносної інсулінової недостатності, викликаного метаболічним ацидозом, спостерігається порушення функціональної активності мітохондрій печінки.

Перспективи подальших досліджень

В подальшому планується продовжити дослідження позитивного впливу екстракту з мідії чорноморської в комплексній терапії при тяжких ускладненнях цукрового діабету, що потребують лікування в умовах відділення інтенсивної терапії, наприклад, при гіперглікемічній гіперосмолярній комі.

Література

1. Evans J.L. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes / J.L. Evans, I.D. Goldfine, B.A. Maddux, G.M. Grodsky // *Endocrine Rev.* – 2002. – V. 23, № 5. – P. 599-622.

2. Raza H. Elevated mitochondrial cytochrome P 450 2E1 and glutathione S-transferase A4-4 in streptozotocin-induced diabetic rats: tissue-specific variations and roles in oxidative stress / H. Raza, S.K. Prabu, M.A. Robin, N.G. Avadhani // *Diabetes.* – 2004 – V. 53, № 1. – P. 185-194.

3. Duchon M.R. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology / M.R. Duchon // *Mol Aspects Med.* – 2004. – V. 25, № 4. – P. 365-451.

4. Maassen J.A. Mitochondrial diabetes: molecular mechanisms and clinical presentation / J.A. Maassen, L.M. Hart, E. Van Essen // *Diabetes.* – 2004 – V. 53. – P. 103-109.

5. Pessler D. D. Oxidative stress impairs nuclear proteins binding to the insulin responsive element in the GLUT4 promoter / D.D. Pessler, A. Rudich, N. Bashan // *Diabetologia.* – 2001. – V. 44, № 12. – P. 2156-2164.

6. Lee S.C. Apoptosis in the pathophysiology of diabetes mellitus / S.C. Lee, S. Pervaiz // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2007. – V. 39. – P. 497-504.

7. Turrens J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species / J. F. Turrens // *J. Physiol.* – 2003. – V. 552. – P. 335-344.

8. Nicholls D. G. The physiological regulation of uncoupling proteins / D. Nicholls // *G. Biochim. Biophys. Acta* – 2006. – V. 1757. – P. 459-466.

9. Poltorak V.V. Supplementation with complex from mussels ameliorated oxidative processes in streptozotocin-induced diabetic rat's liver mitochondria / V.V. Poltorak, A. Shumeyko, T. Ovsyannikova [et al.] // *Diabetologia.* – 2007. – V.50. – P. 360.

10. Ross S.A. Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes / S.A. Ross, E.A. Gulve, M. Wang // *Chem. Rev.* – 2004. – V. 104. – P. 1255-1282.

Реферат

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭКСТРАКТА МИДИИ ЧЕРНОМОРСКОЙ ДЛЯ КОМПЛЕКСНОГО ЛЕЧЕНИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА НА ФОНЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО АЦИДОЗА

Шумейко О.Г.

Ключевые слова: метаболічний ацидоз, сахарний діабет, мітохондрії.

Изучались дыхательные показатели митохондрий печени крыс и гомогенатов поджелудочной железы крыс с моделированным сахарным диабетом на фоне метаболіческого ацидоза при использовании экстракта из мидии черноморской. Определены увеличение скорости дыхания фосфорелирующих митохондрий и улучшение дыхательного контроля. Также при использовании экстракта из мидии черноморской достоверно снижался уровень гидроперекисей в митохондриях печени крыс с моделированным сахарным диабетом 2 типа.

Summary

BLACK SEA MUSSELS EXTRACTION IN COMPLEX THERAPY FOR DIABETES MELLITUS AND CONCOMITANT METABOLIC ACIDOSIS

Shumeyko O.G.

Key words: metabolic acidosis, diabetes, mitochondria.

We studied the respiratory parameters of rat liver mitochondria and homogenates of rat pancreas with simulated diabetic metabolic acidosis under administration of Black Sea mussels extraction. The increased rate of phosphorylating mitochondrial respiration and improved respiratory control was observed. It was demonstrated the administration of Black Sea mussel extraction significantly decreased the level of hydroperoxides in liver mitochondria of rates with simulated type 2 diabetes.