

BIOENERGETIKA PEČEŇOVÝCH MITOCHONDRIÍ PRI EXPERIMENTÁLNO M DIABETES MELLITUS PO PODÁVANÍ RAMIPRILU

ULIČNÁ O., ¹ČÍŽOVÁ M., ¹KOLESÁR P., ²VOLKOVÁ K., ³CIBULOVÁ L., ⁴ČÁRSKY J., ⁵ONDREJKA P.

BIOENERGETICS OF LIVER MITOCHONDRIA IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS AFTER THE ADMINISTRATION OF RAMIPRIL

Background: Diabetes mellitus represents an intense metabolic strain for the liver. Inhibitors of angiotensin-converting enzymes (ACEI) are drugs of choice in the therapy of hypertension in coincidence with diabetes mellitus. The effect of ACEI is complex. The attention is drawn to the study of metabolic effects of ACEI.

Objectives: The aim of the study was to investigate whether the administration of ramipril effects the levels of glycated hemoglobin and fructoseamine in the blood of rats with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), and whether bioenergetics of mitochondria in the liver undergo changes.

Methods: In our experiments, we used rats of the Wistar strain. The control group was composed of healthy animals. The experimental groups were formed by rats with IDDM evoked by streptozotocine (45 mg/kg) and rats with IDDM + ramipril (10 mg/KG). Both, insulin MONO-ID in the dosis of 6 U/kg administered subcutaneously, and water solution of ramipril administered by gastric probe were applied for the period of 8 weeks. We have assessed blood levels of glucose, glycated hemoglobin, fructoseamine and the concentration of cholesterol and triacylglycerols have been assessed also in the liver. Oxidative phosphorylation in mitochondria of the liver were measured polarographically.

Results: In the group with IDDM + ramipril, the glycated haemoglobin (M 6.85 CI 5.7—7.0 %) and fructoseamine (M 1.45 CI 1.2—1.6 mmol/l) have significantly dropped in comparison with the group with IDDM glycated haemoglobin (M 8.8 7.7—10.7 %) and fructoseamine (M 2.04 CI 1.69—2.4

Pozadie problému: Diabetes mellitus predstavuje pre pečeň veľkú metabolickú záťaž. Inhibítory angiotenzín-konvertujúceho enzýmu (ACEI) sú liekmi voľby pri liečbe hypertenzie pri diabetes mellitus. Účinok ACEI je komplexný. Pozornosť sa obracia na štúdium metabolických účinkov ACEI.

Ciel: Cieľom práce bolo zistiť, či podávanie ramiprilu ovplyvní hladiny glykovaného hemoglobínu a fruktóزامínu v krvi potkanov s inzulínne nezávislým diabetes mellitus (IDDM) a či sa zmení bioenergetika mitochondrií v pečeni.

Metódy: V pokusoch sme použili potkany kmeňa Wistar. Kontrolnú skupinu tvorili zdravé zvieratá. Pokusné skupiny tvorili potkany s IDDM vyvolaným streptozotocínom (45 mg.kg⁻¹) a potkany s IDDM + ramipril (10 mg.kg⁻¹). Inzulín MONO-ID v dávke 6 U.kg⁻¹ pod kožu a vodný roztok ramiprilu sondou do žalúdka sme podávali denne počas 8 týždňov. V krvi sme stanovili glukózu, glykovaný hemoglobín, fruktóзамín a koncentráciu cholesterolu a triacylglycerolov aj v pečeni. Oxidačnú fosforyláciu v mitochondriách pečene sme merali polarograficky.

Výsledky: V skupine s IDDM + ramipril významne poklesol glykovaný hemoglobín (M 6,85 CI 5,7—7,0 %) a fruktóзамín (M 1,45 CI 1,2—1,6 mmol.l⁻¹) oproti skupine s IDDM glykovaný hemoglobín (M 8,8 7,7—10,7 %) a fruktóзамín (M 2,04 CI 1,69—2,4 mmol.l⁻¹). Ramipril neovplyvnil koncentrácie cholesterolu a triacylglycerolov v krvi a pečeni u potkanov s IDDM. Ramipril pozitívne ovplyvnil oxidačnú fosforyláciu v mitochondriách pečene pri IDDM. V skupine s IDDM + ramipril sa významne zvýšila rýchlosť spotreby kyslíka pri stimulovanom dýchaní s ADP, stav 3 (M 107,97 CI 96,78—134,51 nAtO.mg bielk⁻¹.min⁻¹) a fosforylačná rýchlosť (M 232,67 CI 209,38—284,97 nmolATP.bielk⁻¹.min⁻¹) oproti skupine s IDDM: stav 3 (M 76,71 CI 66,81—85,99 nAtO.mg bielk⁻¹.min⁻¹) a fosforylačná rýchlosť (M 161,84 CI 143,55—189,99 nmolATP.mg bielk⁻¹.min⁻¹) pri NAD substráte glutamátu. Podobný trend je i pri FAD substráte jantarane.

Záver: Po podávaní ramiprilu potkanom s IDDM sa zlepšili ukazovatele, ktoré vyjadrujú mieru kompenzácie diabetes mellitus. Zvýšená kapacita dýchacieho reťazca a zvýšená tvorba energie v mitochondriách pečene potkanov s IDDM po podávaní ramiprilu poukazuje na zlepšenie metabolickej kapacity pečene. (Tab. 4, lit. 47.)

Kľúčové slová: ramipril, diabetes mellitus, mitochondrie, pečeň, oxidačná fosforylácia.

Farmakobiochemické laboratórium III. internej kliniky Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, ¹III. interná klinika LFUK v Bratislave, ²Ústav výživy ľudu v Bratislave, ³Ústav preventívnej a klinickej medicíny v Bratislave, ⁴Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave a ⁵Nemocnica s poliklinikou Ministerstva vnútra SR v Bratislave
The Pharmacobiochemistry Laboratory, IIIrd Internal Clinic, School of Medicine, Bratislava, ¹IIIrd Internal Clinic, School of Medicine, Bratislava, ²The Institute for Nutrition, Bratislava, ³The Institute of Preventive and Clinical Medicine, Bratislava, ⁴The Institute of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Biochemistry, School of Medicine, Bratislava, and ⁵Hospital of Ministerium of Slovakia, Bratislava
Address for correspondence: O. Uličná, RND, PhD, Farmakobiochem. lab. III. int. kliniky LFUK, Hlboká 7, 811 05 Bratislava, Slovakia.
Phone: +421.7.396 974

mmol/l). Ramipril did not affect the concentration of cholesterol and triacylglycerols in the blood and liver in rats with IDDM. Ramipril has positively affected oxidative phosphorylation in mitochondria of the liver in coincidence with IDDM. The group with IDDM + ramipril has yielded an increase in the velocity of oxygen consumption in coincidence with stimulated breathing with ADP, the state 3 (M 107.97 CI 96.78–134.51 n AtO/mg of proteins/min.) and phosphorylation velocity (M 232.67 CI 209.38–284.97 nmolATP/protein/min) in contrast to the group with IDDM: the state 3 (M 76.71 CI 66.81–85.99 nAtO/mg of proteins/min and the velocity of phosphorylation (M 161.84 CI 143.55–189.99 nmol ATP/mg of proteins/min) in coincidence with substrate glutamate. A similar trend is present also in coincidence with FAD succinate substrate.

Conclusions: After the administration of ramipril to rats with IDDM, the indicators have improved, and they express the rate of compensation of diabetes mellitus. An increased capacity of the respiratory chain and an increased origin of energy in mitochondria in the livers of rats with IDDM after administration of ramipril indicates an improvement in the metabolic capacity of the liver. (Tab. 4. Ref. 47.)

Key words: ramipril, diabetes mellitus, mitochondria, liver, oxidative phosphorylation.

Bratisl Lek Listy 1997; 98: 687–694

Diabetici sú v porovnaní s nediabetickou populáciou ohrození vyššou kardiovaskulárnou morbiditou a mortalitou. Častejšie u nich dochádza k zlyhaniu srdca, infarktu myokardu a cerebrovaskulárnym príhodám (Kannel a McGee, 1979; Rudderman a Haudenschild, 1984; Kuller a spol., 1985; Unsitupa, 1990). Hypertenzia, ktorá sa u diabetikov vyskytuje 2–4-krát častejšie ako u nediabetikov, toto riziko ešte zvyšuje (Widimský a spol., 1987; Rybka a Mistrík, 1989).

Hypertenzia sa teda často kombinuje s diabetes mellitus a títo pacienti sú okrem toho zvlášť ohrození vznikom diabetickej nefropatie. Terapeutický prístup k antihypertenznej liečbe pri diabetes mellitus je dobre prepracovaný (Dzúrik a spol., 1992; Widimský, 1995; Balazovjeh, 1996; Vozár a Stríž, 1996).

Pri liečbe hypertenzie pri diabetes mellitus sú liekmi voľby inhibítory angiotenzínkonvertujúceho enzýmu (ACEI). ACEI ovplyvňujú reninangiotenzinový systém. (Campbell, 1987; Dzau, 1989). Kompetitívnu inhibíciu ACE významne znižujú tvorbu vazokonstriktora angiotenzínu II, ale spomalením degradácie bradykinínu spôsobujú zvýšenie tvorby vazodilatačných prostaglandínov PGI₂, PGE₂ a endoteldependentného relaxačného faktora oxidu dusnatého (NO).

Uvádza sa, že asi 30 % antihypertenzného účinku ACEI je podmienené bradykinínom, ktorý sa zúčastňuje na vazodilatacii koronárneho a renálneho riečiska. Ukázalo sa, že bradykinín má významnú úlohu v kardioprotektívnom účinku ACEI (Martorana a spol., 1990; Linz a Schölkens, 1992).

V popredí záujmu je štúdium metabolických účinkov ACEI, najmä mechanizmus, akým zlepšujú vychytávanie glukózy a znižujú inzulínovú rezistenciu. Zlepšenie metabolizmu glukózy vo svaloch spôsobuje bradykinín, ktorý sa hromadí po inhibícii kinínovej dráhy s ACEI (Roesen a spol., 1983; Linz a spol., 1990; Donnelly, 1992; Leighton a spol., 1996; Rabito a spol., 1996; Figueroa a spol., 1996).

Významnú úlohu v regulácii hladiny glukózy v krvi má pečeň. Glukóza sa vychytáva alebo uvoľňuje z pečene v závislosti od jej koncentrácie v krvi. Inzulín príjem glukózy pečeneovou bunkou neovplyvňuje. Regulačný vplyv inzulínu na glycidový metabolizmus v pečeni spočíva v indukcii biosyntézy kľúčových glykolytických enzýmov (glukokinázy, fosfofruktokinázy a pyruvátkinázy) a glykogénsyntázy a v represii kľúčových enzýmov glukoneogenézy (pyruvátkarboxylázy, fosfoenolpyruvátkarboxykinázy, fruktóza-1,6-bisfosfatázy a glukóza-6-fosfatázy).

Pri diabetes mellitus prejavujú pečeneové mitochondrie morfológické a funkčné abnormality (Harano a spol., 1972). V pečeneových mitochondriách je pri IDDM znížená tvorba energie (Uličná a spol., 1995, 1996).

V našej práci sme chceli zistiť, či podávanie ACE-inhibítora ramiprilu (Tritace, Hoechst) ovplyvní:

— tvorbu glykovaného hemoglobínu a fruktózamínu, ktorých koncentrácie v krvi sú mierou kompenzácie diabetes mellitus;

— bioenergetiku mitochondrií v pečeni potkanov s experimentálne vyvolaným diabetes mellitus.

Materiál a metódy

V pokusoch sme použili potkany—samce kmeňa Wistar s hmotnosťou 260–300 g. Potkany sme kŕmili štandardnou Larsenovou stravou. Mali voľný prístup k potrave a pitnej vode.

Potkany sme rozdelili do nasledovných skupín:

1. kontrolná skupina — zdravé zvieratá, ktorým sme podávali pod kožu fyziologický roztok a do žalúdka sondou pitnú vodu 10 ml.kg⁻¹,

2. pokusná skupina — zvieratá, ktorým sme vyvolali diabetes mellitus závislý od inzulínu (IDDM). Sondou do žalúdka sme tejto skupine podávali pitnú vodu 10 ml.kg⁻¹,

3. pokusná skupina — zvieratá s vyvolaným IDDM, ktorým sme počas 8 týždňov podávali ramipril (Tritace, Hoechst) v dávke 10 mg.kg⁻¹ raz denne. Ramipril sme podávali vo forme vodnej suspenzie sondou do žalúdka.

Diabetes mellitus sme vyvolali jednorazovým podaním streptozotocínu (dávka 45 mg.kg⁻¹, v 0,5 mol.l⁻¹ citrátovom tlmivom roztoku) do chvostovej veny potkanov. Inzulín MONO ID 6 U.kg⁻¹ sme podávali obom pokusným skupinám denne medzi 10. až 11. h počas 8 týždňov. Zvieratá sme dekapitovali. Krv sme zachytili do skúmavky a určili koncentráciu glukózy (Lachema), glykovaného hemoglobínu (Flückinger a Winterhalter, 1976), fruktózamínu (Johnson a spol., 1982), cholesterolu (Bálint, 1962) a triacylglycerolov (Jover, 1963). Malé množstvo pečeneového tkaniva sme použili na stanovenie cholesterolu a triacylglycerolov.

Izolácia mitochondrií: Pečeň sme vybrali do vychladeného izolačného média (4°C). Toto médium obsahovalo: 2,25.10⁻¹ mol.l⁻¹ manitolu, 7,5.10⁻² mol.l⁻¹ sacharózy, 2.10⁻⁴ mol.l⁻¹ EDTA, pH sme upravili na 7,4 (Palmer a spol., 1977). Homogenát pečeneového tkaniva sme pripravili v homogenizačnej súprave teflón-sklo za stáleho chladenia pri 4 °C. V chladenej centrifúge Janetzki K 24 sme 10 % homogenát centrifugovali 10 minút pri 3500 otáčok za minútu, čím sme odstránili bunkovú drvinu a jadrá. Supernatant sme 12 minút centrifugovali pri 8500 otáčok za minútu. Sediment mitochondrií sme premyli a opäť centrifugovali, toto sme opakovali 2-krát. Sedimentované mitochondrie sme nakoniec resuspendovali tak, aby bol obsah bielkovín 4–6 mg na 0,1 ml suspenzie.

Tab. 1. Koncentrácia glukózy, hemoglobínu, glykovaného hemoglobínu a fruktóзамínu v krvi potkanov s inzulín-dependentným diabetes mellitus a po podávaní ramiprilu.**Tab. 1. Concentration of blood glucose, hemoglobin, glycated hemoglobin and fructoseamine in rats with insulin-dependent diabetes mellitus and after treatment with ramipril.**

Krv	Štatistické ukazovatele	Kontrola	IDDM	IDDM + RAMIPRIL	KW	Nemenyihó test
Blood	Statistical parameters	Control	IDDM	IDDM + RAMIPRIL		Nemenyi test
Glukóza	n	8	16	22		K:IDDM *
	M	9,17	42,58	37,23	p<	K:IDDM +
Glukose (mmol.l ⁻¹)	CI	8,16-9,82	31,25-50,19	17,19-47,06	0,001	RAMIPRIL *
						IDDM:IDDM + RAMIPRIL -
Hemoglobín	n	8	16	22		K:IDDM -
	M	1,50	1,50	1,49	n.s.	K:IDDM +
Hemoglobin (%)	CI	1,43-1,56	1,47-1,53	1,43-1,53		RAMIPRIL -
						IDDM:IDDM + RAMIPRIL -
Glykovaný hemoglobín	n	8	16	22		K:IDDM *
	M	3,95	8,80	6,85	p<	K:IDDM +
Glycated hemoglobin (%)	CI	3,70-5,60	7,0-10,70	5,70-7,0	0,001	RAMIPRIL *
						IDDM:IDDM + RAMIPRIL *
Fruktóзамín	n	8	16	22		K:IDDM *
	M	1,12	2,04	1,45	p<	K:IDDM +
Fructoseamine (mmol.l ⁻¹)	CI	0,68-1,60	1,69-2,40	1,20-1,60	0,001	RAMIPRIL -
						IDDM:IDDM + RAMIPRIL *

Vysvetlivky:

n - počet členov súboru

M - medián

CI - 95 % konfidenčný interval

IDDM - inzulín-dependentný diabetes mellitus

KW - Kruskal-Wallisov test

p - významnosť

* - významnosť p<0,05

Legend:

n - number

M - median

CI - 95 % confidence interval

IDDM - insulin-dependent diabetes mellitus

KW - Kruskal-Wallisov test

p - significance

* - significance p<0,05

Množstvo mitochondriálnych bielkovín sme určili metódou podľa Lowryho a spol. (1951).

V izolovaných mitochondriách pečene sme určili oxidačnú fosforyláciu. Polarografické meranie sme robili pri 30 °C pomocou kyslíkovej Clarkovej elektródy na oxygrafe Gilson 5/6 H. Inkubačné médium obsahovalo: 1.10² mol.l⁻¹ HEPES, 5.10⁻³ mol.l⁻¹ KH₂PO₄, 1,2.10⁻¹ mol.l⁻¹ KCl, 5.10⁻⁴ mol.l⁻¹ EDTA, 2 % dextran, pH sme upravili na 7,2 (Rouslin a Millard, 1980).

Mitochondrie oxidovali alebo NAD-substrát glutamát sodný alebo FAD-substrát jantaran sodný/rotenon. Ich koncentrácia v inkubačnom médiu bola 5.10⁻³ mol.l⁻¹. Adenozindisfosfát (ADP) sme pridávali do inkubačného média tak, aby jeho výsledná koncentrácia bola 500 nmolov.

Pri štatistickom porovnávaní výsledkov sme použili neparametrický Kruskalov—Wallisov test. Tento test umožní zistiť, či sú významné rozdiely medzi porovnávanými skupinami (t.j. medzi kontrolnou skupinou, skupinou s IDDM a skupinou s IDDM + ramipril). Ak sme Kruskalovým—Wallisovým testom dokázali, že medzi porovnávanými skupinami je významný rozdiel, v ďalšom

štatistickom hodnotení sme použili Nemenyihó test. Tento test potom konkrétne upresní, medzi ktorými skupinami sú významné rozdiely na 95 % hladine významnosti.

Výsledky

Obidve pokusné skupiny potkanov, u ktorých sme vyvolali diabetes mellitus, mali významne zvýšenú koncentráciu glukózy (tab. 1) v krvi oproti zdravým kontrolám. V skupine potkanov s IDDM, ktorým sme podávali ramipril, sa koncentrácia glukózy v krvi veľmi mierne znížila oproti skupine s IDDM samým.

Hodnoty glykovaného hemoglobínu (tab. 1) boli významne zvýšené v skupine s IDDM aj v skupine s IDDM a ramiprilom oproti kontrolnej skupine. Porovnaním skupiny s IDDM a skupiny s IDDM a ramiprilom sme zistili, že hodnoty glykovaného hemoglobínu boli v skupine, ktorej sme podávali ramipril, významne nižšie.

Koncentrácia fruktóзамínu (tab. 1) u potkanov s IDDM významne stúpla oproti kontrolám. V skupine s IDDM a ramiprilom bola významne nižšia ako v skupine s IDDM.

Tab. 2. Koncentrácia cholesterolu a triacylglycerolov v krvi a pečeni potkanov s inzulíndependentným diabetes mellitus a po podávaní ramiprilu. Tab. 2. Concentration of blood and liver cholesterol and triacylglycerols in rats with insulin-dependent diabetes mellitus and after treatment with ramipril.

	Štatistické ukazovatele Statistical parameters	Kontrola Control	IDDM	IDDM + RAMIPRIL	KW	Nemenyiho test Nemenyi test
Cholesterol krv/blood	n	6	17	23		K:IDDM -
	M	1,28	2,26	2,30		K:IDDM +
Cholesterol (mmol.l ⁻¹)	CI	1,13-2,47	1,75-2,35	1,75-2,54	n.s.	RAMIPRIL -
						IDDM:IDDM + RAMIPRIL -
Triacylglyceroly krv/blood	n	6	17	23		K:IDDM *
	M	0,87	1,45	1,32	p<	K:IDDM +
Triacylglycerols (mmol.l ⁻¹)	CI	0,51-1,07	1,22-1,95	1,13-1,75	0,05	RAMIPRIL -
						IDDM:IDDM + RAMIPRIL -
Cholesterol pečeň/liver	n	6	17	23		K:IDDM -
	M	4,40	5,05	4,46		K:IDDM +
Cholesterol (mmol.kg ⁻¹)	CI	3,84-5,20	4,97-5,13	4,26-4,96	n.s.	RAMIPRIL -
						IDDM:IDDM + RAMIPRIL -
Triacylglyceroly pečeň/liver	n	6	17	23		K:IDDM *
	M	5,08	7,26	7,39	p<	K:IDDM +
Triacylglycerols (mmol.kg ⁻¹)	CI	4,19-5,99	6,57-8,26	6,06-7,97	0,005	RAMIPRIL *
						IDDM:IDDM + RAMIPRIL -

Vysvetlivky pozri v tabuľke 1.

Legend see in Table 1.

Hodnoty hemoglobínu v jednotlivých skupinách neboli zmenené (tab. 1).

Koncentrácia cholesterolu v krvi a pečevom tkanive sa v jednotlivých porovnávaných skupinách významne nemenila (tab. 2).

Koncentrácia triacylglycerolov (tab. 2) v krvi sa významne zvýšila v skupine s IDDM oproti kontrole. Koncentrácia triacylglycerolov v pečevom tkanive sa významne zvýšila v skupine s IDDM i v skupine s IDDM + ramipril v porovnaní s kontrolnou skupinou zdravých zvierat, steatóza pečene nevznikla. Ramipril neovplyvnil koncentráciu cholesterolu a triacylglycerolov v krvi a pečeni.

Ukazovatele oxidačnej fosforylácie v mitochondriách sme v sledovaných skupinách merali za podmienok, že mitochondrie oxidovali buď NAD-substrát glutamát sodný alebo FAD-substrát jantaran sodný.

Ak sme použili NAD-substrát glutamát sodný (tab. 3), zistili sme, že sa zhoršili ukazovatele oxidačnej fosforylácie u potkanov s IDDM oproti kontrole. Významne klesli: koeficient oxidačnej fosforylácie (ADP:O), rýchlosť spotreby kyslíka pri stimulovanom dýchaní s ADP v stave 3 (QO₂(S₃)) a fosforylačná rýchlosť (OPR). U potkanov s IDDM a ramiprilom sa oproti kontrolnej skupine významne znížil koeficient oxidačnej fosforylácie a fosforylačná rýchlosť. Podávanie ramiprilu potkanom s IDDM malo za následok zlepšenie ukazovateľov oxidačnej fosforylácie oproti skupine s IDDM, hodnoty QO₂(S₃), QO₂(S₄) a OPR sa významne zvýšili.

Ak mitochondrie oxidovali FAD-substrát jantaran sodný (tab. 4), klesli ukazovatele oxidačnej fosforylácie v mitochondriách pečene u potkanov s IDDM oproti kontrole. Významne klesla hodnota indexu respiračnej kontroly (RCI). Táto hodnota bola významne znížená aj v skupine potkanov s s IDDM a ramiprilom oproti kontrole. Rýchlosť spotreby kyslíka v stave 3 a fosforylačná rýchlosť sa v skupine s IDDM + ramipril významne zvýšili oproti skupine s IDDM a dosiahli úroveň kontrolných hodnôt.

Diskusia

IDDM, ktorý sme vyvolali streptozotocínom a liečili jednorazovou dávkou inzulínu denne, môžeme považovať za nedostatočne kompenzovaný. Zistili sme vysoké hladiny glukózy v krvi. Našli sme aj vysoké hodnoty glykovaného hemoglobínu a fruktózamínu, ktoré informujú o dlhodobej kompenzácii diabetes mellitus. Bezpečná hodnota glykovaného hemoglobínu, ktorá je u diabetikov I. typu dlhodobo nevyhnutná pre prevenciu a spomalenie rozvoja diabetických komplikácií, nie je jednoznačne určená. Roku 1993 sa ukončila DCCT štúdia (Diabetes Control and Complications Trial), ktorá dokázala, že existuje priamy vzťah medzi glykémiou a komplikáciami pri IDDM, pochopiteľne existujú aj ďalšie faktory genetické a iné (American Diabetes Association, 1993; DCCT Research Group, 1993). V tejto štúdii sa v skupine diabetikov s IDDM s tzv. intenzívnym inzulínovým režimom dosa-

Tab. 3. Oxidačná fosforylácia v pečňových mitochondriách s inzulíndependentným diabetes mellitus a po podávaní ramiprilu — substrát glutamát sodný.**Tab. 3. Oxidative phosphorylation in liver mitochondria in rats with insulin-dependent diabetes mellitus and after treatment with ramipril — substrate sodium glutamate.**

Substrát-glutamát Substrate glutamate	Štatistické ukazovatele Statistical parameters	Kontrola Control	IDDM IDDM	IDDM + RAMIPRIL IDDM + RAMIPRIL	KW	Nemenyihó test Nemenyi test
RCI (S ₃ , S ₄ ⁻¹)	n	12	21	31	n.s.	K:IDDM -
	M	8,14	7,50	6,96		K:IDDM + RAMIPRIL -
	CI	6,88-9,33	5,08-8,89	6,56-8,44		IDDM:IDDM + RAMIPRIL -
ADP:O (nmolADP.nAtO ⁻¹)	n	12	21	31	p<0,005	K:IDDM *
	M	3,06	2,22	2,35		K:IDDM + RAMIPRIL *
	CI	2,31-3,1	2,07-2,49	2,15-2,44		IDDM:IDDM + RAMIPRIL -
QO ₂ (S ₃) (nAtO.mg prot ⁻¹ .min ⁻¹)	n	12	21	31	p<0,001	K:IDDM *
	M	106,62	76,71	107,97		K:IDDM + RAMIPRIL -
	CI	101,68-118,46	66,81-85,99	96,78-134,51		IDDM:IDDM + RAMIPRIL *
QO ₂ (S ₄) (nAtO.mg prot ⁻¹ .min ⁻¹)	n	12	21	31	p<0,01	K:IDDM -
	M	13,09	10,38	15,27		K:IDDM + RAMIPRIL -
	CI	8,92-17,31	8,91-13,16	10,91-16,81		IDDM:IDDM + RAMIPRIL *
OPR (nmolATP.mg prot ⁻¹ .min ⁻¹)	n	12	21	31	p<0,001	K:IDDM *
	M	356,11	161,84	232,67		K:IDDM + RAMIPRIL *
	CI	317,98-370,92	143,55-189,99	209,38-284,97		IDDM:IDDM + RAMIPRIL *

Vysvetlivky: n - počet členov súboru, M - medián, CI - 95 % konfidenčný interval, IDDM - inzulíndependentný diabetes mellitus, KW - Kruskal-Wallisov test, p - významnosť, * - významnosť p<0,05, RCI - respiračný kontrolný index, ADP:O - koeficient oxidačnej fosforylácie, QO₂(S₃) - rýchlosť spotreby kyslíka mitochondriami pri stimulovaní s ADP, QO₂(S₄) - bazálna spotreba kyslíka mitochondriami, OPR - fosforylačná rýchlosť.

Legend: n - number, M - median, CI - 95 % confidence interval, IDDM - insulin-dependent diabetes mellitus, KW - Kruskal-Wallis test, p - significance, * - significance p<0.05, RCI - respiration control index, ADP:O - coefficient of oxidative phosphorylation, QO₂(S₃) - uptake of oxygen by mitochondria with ADP, QO₂(S₄) - basal uptake of oxygen by mitochondria, OPR - oxidative phosphorylation rate.

hovali priemerné hodnoty glykémie 8,6 mmol.l⁻¹ a hodnoty glykovaného hemoglobínu HbA_{1c} 7,2 %, pričom za normálny priemer sa považuje glykémia 6,05 mmol.l⁻¹ a hodnota HbA_{1c} sa rovná, alebo je menšia ako 6,05 %.

Pri vysokej koncentrácii glukózy v krvi dochádza k zvýšeniu stupňa neenzymatickej glykácie bielkovín. Pri tomto dejí sa tvoria vysokoreaktívne formy kyslíka - superoxidový radikál a peroxid vodíka (Jaing a spol., 1990). Diabetes mellitus teda reprezentuje stav zvýšeného oxidačného stresu, keď dochádza k porušeniu rovnováhy medzi tvorbou a aktivitou antioxidantných obraných mechanizmov v neprospech antioxidantnej ochrany.

Glykované bielkoviny majú modifikované štruktúry, čo sa prejaví morfológickými a funkčnými zmenami (Cerami a spol., 1979; Monnier, 1981). Za podmienok oxidačného stresu pri diabetes mellitus sa zvyšuje peroxidácia lipidov (Sato a spol., 1979; Jain a spol., 1989). Glykácia bielkovín a peroxidácia lipidov má za

následok narušenie membrán buniek a subcelulárnych štruktúr, ako sú mitochondrie a endoplazmatické retikulum, poškodenie lipidov a apolipoproteínových zložiek v krvi (Lyons, 1993; Sinclair, 1993), poškodenie DNK a podobne.

Podávanie ramiprilu potkanom s IDDM významne znížilo hladinu glykovaného hemoglobínu a fruktóзамínu. Túto skutočnosť považujeme za pozitívnu, lebo každé zlepšenie kompenzácie diabetes mellitus pomáha odďaľovať rozvoj a progresiu diabetických komplikácií.

Pri IDDM podmieňuje rôznu stupeň nedostatku inzulínu kvalitatívne aj kvantitatívne zmeny hodnôt lipidov a lipoproteínov. Pri nedostatku inzulínu sa zvyšuje lipolýza v tukovom tkanive. Mastné kyseliny sa v zvýšenej miere vychytávajú pečňou. Esterifikujú sa s glycerol-3-fosfátom a ukladajú ako triacylglyceroly — rozvíja sa diabetická steatóza pečene. Časť mastných kyselín sa využíva na syntézu lipoproteínov s veľmi nízkou hustotou (VLDL),

Tab. 4. Oxidačná fosforylácia v pečňových mitochondriách s inzulín-dependentným diabetes mellitus a po podávaní ramiprilu — substrát jantaran sodný.**Tab. 4. Oxidative phosphorylation in liver mitochondria in rats with insulin-dependent diabetes mellitus and after treatment with ramipril — substrate sodium succinate.**

Substrát-jantaran Substrate succinate	Štatistické ukazovatele Statistical parameters	Kontrola Control	IDDM IDDM	IDDM + RAMIPRIL IDDM + RAMIPRIL	KW	Nemenyihó test Nemenyi test
RCI (S ₃ -S ₄ ⁻¹)	n	16	21	28	p< 0,001	K:IDDM *
	M	4,11	2,34	2,56		K:IDDM + RAMIPRIL *
	CI	3,90-4,50	2,25-2,75	2,17-2,78		IDDM:IDDM + RAMIPRIL -
ADP:O (nmolADP.nAtO ⁻¹)	n	16	21	28	n.s.	K:IDDM -
	M	1,57	1,47	1,48		K:IDDM + RAMIPRIL -
	CI	1,49-1,68	1,32-1,58	1,34-1,50		IDDM:IDDM + RAMIPRIL -
QO ₂ (S ₃) (nAtO.mg prot ⁻¹ .min ⁻¹)	n	16	21	28	p< 0,005	K:IDDM -
	M	225,86	182,70	253,22		K:IDDM + RAMIPRIL -
	CI	203,91-243,62	116,29-276,82	234,05-272,35		IDDM:IDDM + RAMIPRIL *
QO ₂ (S ₄) (nAtO.mg prot ⁻¹ .min ⁻¹)	n	16	21	28	p< 0,001	K:IDDM -
	M	67,52	79,65	92,98		K:IDDM + RAMIPRIL *
	CI	32,01-74,57	44,72-106,13	78,73-118,28		IDDM:IDDM + RAMIPRIL -
OPR (nmolATP.mg prot ⁻¹ .min ⁻¹)	n	16	21	28	p< 0,05	K:IDDM -
	M	358,02	270,60	396,99		K:IDDM + RAMIPRIL -
	CI	289,35-313,95	140,95-405,05	303,95-407,61		IDDM:IDDM + RAMIPRIL *

Vysvetlivky pozri v tabuľke 3.

Legend see in Table 3.

ktoré sa vracajú do krvného obehu a spôsobujú hyperlipoproteínemiu IV. V pečeni sa masné kyseliny odbúravajú cestou β -oxidácie a vo zvýšenej miere dochádza k tvorbe ketolátok.

Pri našich experimentálnych podmienkach u IDDM stúpila koncentrácia triacylglycerolov v krvi i pečeni. Zvýšenie však nepresiahlo fyziologické hodnoty v krvi potkanov a koncentrácia v pečeni nedosiahla hodnoty, aké nachádzame v steatotickéj pečeni. Koncentrácia cholesterolu v krvi a pečeni sa významne nezmenila. Ramipril za týchto podmienok neovplyvnil koncentrácie triacylglycerolov a cholesterolu v krvi a v pečňovom tkanive.

Vo svaloch a v tukovom tkanive vedie absolútny alebo relatívny nedostatok inzulínu k zníženému vychytávaniu glukózy a odbúravaniu glykogénu. Zníženú schopnosť myokardu vychytávať a metabolizovať glukózu dokázali viaceré experimentálne i klinické štúdie (Sivitz a spol., 1989; Mueckler, 1990; Bell, 1991), čo sa ukazuje charakteristické pre diabetes mellitus I. a II. typu. Znížené vychytávanie glukózy prispieva veľkou mierou k nedostatocnej tvorbe energie pri diabetes mellitus a znižuje schopnosť diabetickeho srdca prispôbiť energetickú zásobu metabolickým a funkčným potrebám (Taegtmeyer a Passmore, 1985).

Štúdie na kardiomyocytoch a na perfundovanom srdci inzulínrezistentných potkanov dokázali, že znížené vychytávanie glukózy spôsobuje narušená translokácia a expresia glukózového transportéra GluT4 (Petersen a spol., 1991; Rett a spol., 1996). Znížené množstvo bielkovín GluT4 sa našlo u potkanov pri IDDM vyvolanom streptozotocínom (Garvey a spol., 1993; Hoenack a Roesen, 1996).

ACE aktivita má dôležitú úlohu v regulácii vychytávania glukózy a inzulínovej senzitivite. Tento metabolický efekt je dôležitý pri patologických stavoch, ako napr. diabetes mellitus alebo srdcová ischemia, keď myokard preferuje ako zdroj energie glukózu pred masnými kyselinami (Taegtmeyer a Passmore, 1985). Glukóza je však pri týchto stavoch menej dostupná, lebo je narušený prenášač GluT4.

Dôležitou funkciou pečene je udržiavanie koncentrácie glukózy v krvi vo fyziologických hraniciach. Na rozdiel od svalov a tukového tkaniva vychytávanie glukózy pečňou inzulín priamo neovplyvňuje. Na regulácii metabolizmu glukózy v pečeni sa inzulín zúčastňuje tak, že stimuluje glykolyzu, inhibuje glukoneogénu a stimuluje syntézu glykogénu.

Niektoré dôležité biochemické reakcie, ktoré určujú mieru metabolickej poruchy pri diabetes mellitus, sú lokalizované v pečenejších mitochondriách. Mitochondrie pečene sú miestom β -oxidácie mastných kyselín a premeny pyruvátu na acetyl-Co-A. Prebieha v nich tvorba ketolátok, obsahujú enzýmy citrátového cyklu, nachádzajú sa v nich pyruvátcarboxyláza — kľúčový krok glukoneogenézy, časť močovínového cyklu. Čiastočne tu prebieha syntéza porfyrínov a hemu a obsahujú dýchací reťazec spojený s oxidačnou fosforyláciou.

Akým spôsobom môžu ACEI ovplyvniť energetický metabolizmus v pečeni nie je dostatočne objasnené. Pri IDDM, ktorý sme vyvolali streptozotocínom, sme zistili zníženú oxidačnú fosforyláciu v pečenejších mitochondriách i v predchádzajúcich pokusoch (Uličná a spol., 1995, 1996). Podávanie ACEI ramiprilu malo pozitívny vplyv na ukazovatele oxidačnej fosforylácie v mitochondriách pečene potkanov s IDDM. Významne sa zvýšila rýchlosť tvorby ATP v pečenejších mitochondriách.

Diabetes mellitus predstavuje pre pečeň veľkú metabolickú záťaž. Skutočnosť, že sa po podávaní ramiprilu zlepšila tvorba energie v pečenejších mitochondriách potkanov s IDDM, považujeme za významnú, lebo súvisí so zlepšením metabolickej kapacity pečene.

Priaznivá energetická bilancia je nevyhnutná pre endergonické procesy — biosyntézu, funkciu iónových púmp membrán (aktívny transport), svalové kontrakcie a nervový vzruch. Ak by rýchlosť tvorby ATP klesla pod hladinu, ktorá je potrebná pre udržanie týchto procesov, došlo by k nevratnému bunkovému poškodeniu.*

Literatúra

American Diabetes Association: Implication of the Diabetes control and complications. *Trial. Clin. Diabetes*, 11, 1993, č. 4, s. 91—96.

Balažovjeh I.: Arteriálna hypertenzia. *Med. Monitor*, 6, 1996, s. 1—14.

Bálint P.: Klinikai laboratórium diagnostika. Budapest, Egészségügyi Kiadó 1962, 599s.

Bell G.I.: Lilly Lecture 1990: Molecular defects in diabetes mellitus. *Diabetes*, 40, 1991, s. 413—422.

Campbell D.J.: Circulating and tissue angiotensin system. *J. clin. Invest.*, 79, 1987, s. 1—6.

Cerami A., Stevens V.J., Monnier V.M.: Role of nonenzymatic glycosylation in the development of the sequelae of diabetes mellitus. *Metabolism*, 28, 1979, s. 431—436.

The Diabetes control and complications trial research group: The effect of insulin treatment of diabetes on the development and progression of long-term complication in insulin dependent diabetes mellitus. *New Engl. J. Med.*, 329, 1993, s. 972—986.

Donnelly R.: Angiotensin-converting enzyme inhibitors and insulin sensitivity: metabolic effect in hypertension, diabetes and heart failure. *J. cardiovasc. Pharmacol.*, 20, 1992, s. S38—S44.

Dzau V.J.: Short- and long-term determination of cardiovascular function and therapy: contribution of circulating and tissue renin angiotensin system. *J. cardiovasc. Pharmacol.*, 14, 1989, Suppl. 4, s. S1—S4.

Dzúrik R., Fedelešová V., Pavlovič M.: Liečba hypertenzie pri diabetes mellitus. *Slov. Lek.*, 2, 1992, s. 15—17.

Figuroa C.D., Dietze G., Müller-Esterl W.: Immunolocalization of bradykinin B_2 receptors on skeletal muscle cells. *Diabetes*, 45, 1996, Suppl. 1, s. S24—S28.

Flückiger R., Winterhalter K.H.: In vitro synthesis of hemoglobin A_{1c} . *FEBS Lett.*, 71, 1976, č. 1, s. 356—360.

Garvey W.T., Hardin D., Juhaszova M., Dominguez J.H.: Effects of diabetes on myocardial glucose transport system in rats: implications for diabetic cardiomyopathy. *Amer. J. Physiol.*, 264, 1993, s. H837—H844.

Harano Y., DePalma R.G., Lavine L., Miller M.: Fatty acid oxidation, oxidative phosphorylation and ultrastructure of mitochondria in the diabetic rat liver. *Diabetes*, 21, 1972, č. 5, s. 257—270.

Hoernack C., Roesen P.: Inhibition of angiotensin type 1 receptor prevents decline of glucose transporter (GLUT4) in diabetic rat heart. *Diabetes*, 45, 1996, Suppl. 1, s. S81—S87.

Jain S.K., McVie R., Duett J., Herbst J.J.: Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. *Diabetes*, 38, 1989, s. 1539—1543.

Jaing Z.-Y., Wollard A.C.J., Wolff S.P.: Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBS Lett.*, 268, 1990, s. 69—71.

Johnson R.N., Metcalf P.A., Baker J.R.: Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clin Chim. Acta*, 127, 1982, s. 87—95.

Jover A.: Technique for the determination of serum glycerides. *J. Lipid Res.*, 4, 1963, s. 228—230.

Kannel W.B., McGee D.L.: Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *J. Amer. med. Ass.*, 241, 1979, s. 235—238.

Kuller L.H., Dorman J.L., Wolf P.A.: Cerebrovascular disease and diabetes. In: *Diabetes in America* V.S. Dept. of Health and Human Services 1985: NIH publ. No 85-1468 p XVIII-1-18, Washington D.C.

Leighton B., Sanderson A.L., Young M.E., Radda G.K., Boehm E.A., Clark J.F.: Effect of treatment of spontaneously hypertensive rats with the angiotensin-converting enzyme inhibitor Trandolapril on sensitivity of glucose metabolism to insulin in rat soleus muscle in vitro. *Diabetes*, 45, 1996, Suppl. 1, s. S120—S124.

Linz W., Schölkens B.A.: A specific B_2 -bradykinin receptor antagonist HOE 140 abolishes the antihypertrophic effect of ramipril. *Brit. J. Pharmacol.*, 105, 1992, s. 771—772.

Lowry H.O., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 1951, s. 265—270.

Lyons T.J.: Glycation and oxidation: a role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Amer. J. Cardiol.*, 71, 1993, č. 6, s. 26B—31B.

Martorana P.A., Kettenback B., Breipohl G., Linz W., Schölkens B.A.: Reduction of infarct size by local angiotensin-converting enzyme inhibition is abolished by bradykinin antagonist. *Europ. J. Pharmacol.*, 182, 1990, s. 395—396.

Monnier V.M.: Nonenzymatic browning in vivo: Possible process for aging of long-lived proteins. *Science*, 211, 1981, s. 491—493.

Mueckler M.: Family of glucose-transporter genes: implications for glucose homeostasis and diabetes. *Diabetes*, 39, 1990, s. 6—11.

*Technická spolupráca: Ester Eftimová, Ludmila Butašová, Danka Opálená. Prezentované výsledky sú súčasťou riešenia grantovej úlohy č. 1/2135/95.

- Palmer J.W., Tandler B., Hoppler L.C.:** Biochemical properties subsarcolemal and interfibrillar mitochondria isolated from cardiac muscle. *J. Biol. Chem.*, 252, 1977, s. 8731–8739.
- Petersen S., Russ m., Reinauer H., Eckel J.:** Inverse regulation of glucose transporter Glut4 and G-protein Gs mRNA expression in cardiac myocytes from insulin resistant rats. *FEBS Lett.*, 286, 1991, s. 1–5.
- Rabito S.F., Minshall D.R., Nakamura F., Wang L.X.:** Bradykinin B₂ receptors on skeletal muscle are coupled to inositol 1,4,5-Trisphosphate formation. *Diabetes*, 45, 1996, Suppl. 1, s. S29–S33.
- Reft K., Lotz N., Wicklmayer M. et al.:** Verbesserte Insulinwirkung durch ACE-Hemmung beim Typ II-Diabetiker. *Dtsch. Med. Wschr.*, 113, 1988, s. 243–249.
- Rett K., Wicklmayer M., Dietze G.J., Häring H.U.:** Insulin-induced glucose transporter (GLUT1 and GLUT4) translocation in Cardiac Muscle tissue is mimicked by bradykinin. *Diabetes*, 45, 1996, Suppl. 1, s. S66–S69.
- Roesen P., Eckel J., Reinauer H.:** Influence of bradykinin on glucose uptake and metabolism studied in isolated cardiac myocytes and isolated perfused rat hearts. *J. Biol. Chem.*, 364, 1983, s. 1431–1438.
- Rouslin W., Millard R.W.:** Canine myocardial ischemia. Defect in mitochondrial electron transfer complex. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 12, 1980, s. 639–645.
- Rudderman N.B., Haudenschild Ch.:** Diabetes as an atherogenic factor. *Progr. cardiovasc. Dis.*, 26, 1984, č. 5, s. 373–412.
- Rybka J., Mistrík J.:** Některé zvláštní problémy u diabetiků s hypertenzí. *Vnitř. Lék.*, 35, 1989, č. 8, s. 772–779.
- Sato J., Hotta N., Sakamoto M., Matsuoka S., Obishi N., Yagi K.:** Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochem. Med.*, 21, 1979, s. 104–107.
- Sinclair J.A.:** Free radical mechanisms and vascular complications in diabetes mellitus. *Diabet. Rev.*, 2, 1993, č. 2, s. 7–10.
- Sivitz W.I., DeSautel S.L., Kayano T., Bell G.I., Pessin J.E.:** Regulation of glucose transporter messenger RNA in insulin-deficient states. *Nature*, 340, 1989, s. 72–74.
- Taegtmeier H., Pasmore J.M.:** Defective energy metabolism of the heart in diabetes. *Lancet*, 1, 1985, s. 139–141.
- Uličná O., Volková K., Šnircová M., Kucharská J., Gvozdjaková A.:** Oxidačná fosforylácia v pečeni a srdci potkanov s inzulíndependentným diabetom. S. 123. In: Zborník abstraktov XIV. biochemických dní, 6.–8. september, Bratislava, 1995, 218s.
- Uličná O., Volková K., Ištvanová B.:** Bioenergetika mitochondrií pečene potkana pri experimentálnom inzulíndependentnom diabete. *Bratisl. lek. Listy*, 97, 1996, č. 10, s. 619–624.
- Unsitupa M.I.J.:** Diabetic heart muscle disease. *Ann. Med.*, 22, 1990, č. 2, s. 377–386.
- Vozár J., Stríž B.:** Porovnanie jednotlivých antihypertenzív v liečbe hypertenzie pri diabete 2. typu. *Slov. Lek.*, 1, 1996, s. 27–31.
- Widimský J., Rybka J., Lefflerová K.:** Léčba hypertenze u cukrovky. *Vnitř. Lék.*, 33, 1987, č. 4, s. 383–389.
- Widimský J.:** Kardiovaskulární orgánové projevy esenciální hypertenze — možnost cílené léčby a prevence. *Vnitř. Lék.*, 41, 1995, č. 6, s. 403–410.

Do redakcie došlo 6.4.1997.

RECENZIA

I. Hulín et al.: *Patofyziológia*. Slovak Academic Press, Bratislava 1996, 683 str., 103 vyobrazení, cena neuvedena.

Patologická fyziologie pojednává o příčinách, které vedou k zahájení patologického procesu, i o mechanismech, které se v těle rozvíjejí v průběhu choroby. Obojí je pak východiskem pro kauzální léčbu. Proto je patologická fyziologie jedním ze základních oborů preklinického studia medicíny. Teorie, ale důležitá pro lékařskou praxi — výstižně ji vyjadřuje motto, které čteme na první straně nové slovenské učebnice: „*Bez patofyziologie se mohou zmírňovat projevy nemoci, ale její podstata se tím neřeší a často ani nepozná!*“

Učebnice má tradiční členění v 16 kapitolách, desetinně tříděných, ve kterých je zachycena patologie velkých systémů (respiračního, kardiovaskulárního, krve, uropoetického, gastrointestinálního, endokrinního, nervového a kůže), případně specializovaných

částí lidského těla (kostí, koubů, vnitřního prostředí, smyslů), ale i různých fyziologických (těhotenství, šestinedělí, klimakterium, stárnutí) i patologických stavů (horečka, zánět, nádorové bujení, šok). A to vše ilustrováno 103 obrázky (některý text by zasloužil vyobrazení více). Jednotlivé kapitoly většinou vycházejí z anatomického a fyziologického úvodu, zachycují obecné patofyziologické poznatky a soustřeďují se na rozbor jednotlivých symptomů, syndromů a chorob. Text je napsán moderně, živě a srozumitelně. Přece jsem však poněkud postrádal samostatné zařazení takových stavů, jako je patofyziologie imunity nebo dědičnosti, popřípadě např. receptorové nemoci. Kniha se prodává i v České republice a podle specializovaných knihkupců je o ni zájem. A to je jistě největší odměnou profesoru Hulínovi a jeho více než dvaceti spolupracovníkům.

S. Trojan
Čs. Fyziol., 46, 1997, č. 3, s. 121