

THE EFFECT OF NEONATALLY INDUCED STREPTOZOTOCINE DIABETES ON HEPATIC MITOCHONDRIAL BIOENERGETICS IN ADULT RATS

ULIČNÁ O., ¹ZLATOŠ L., ¹HOLZEROVÁ J., ¹KVASZOVÁ E., ²ČÁRSKY J., GVOZDJÁKOVÁ A., KUCHARSKÁ J., BADA V.

VPLYV STREPTOZOTOCÍNOVÉHO DIABETU VYVOLANÉHO V NEONATÁLNO M OBDOBÍ NA BIOENERGETIKU MITOCHONDRIÍ PEČENE DOSPELÝCH POTKANOV

Abstract

Uličná O, Zlatos L, Holzerova J, Kvaszova E, Carsky J, Gvozdjakova A, Kucharska J, Bada V:
The Effect of Neonatally Induced Streptozotocine Diabetes on Hepatic Mitochondrial Bioenergetics in Adult Rats
Bratisl Lek Listy 1999; 100 (1): 5–11

Background: Previous experimental studies focused on the liver mitochondrial bioenergetic changes in diabetes mellitus type I induced in adult animals. Information about the effects of persisting neonatally induced diabetes mellitus type I on the mitochondrial bioenergetics are missing.

Aim: The aim of the study was to assess the degree of diabetes mellitus compensation and parameters of oxidative phosphorylation in rats aged 3 months with DM persisting from neonatal period.

Methods: DM was induced in male Wistar rats by repeated intraperitoneal administration of streptozotocine 45 mg/kg on 2nd and 9th day after birth. The concentrations of glucose, glycosylated haemoglobin, fructosamine were detected in the blood and the concentration of cholesterol and triacylglycerols in the blood and liver tissue, respectively. After mitochondria isolation from the liver we measured parameters of oxidative phosphorylation by polarography using Clark oxygen electrode.

Results: In the group of neonatally induced DM the concentration of glucose (23.10 ± 1.55 vs 8.3 ± 0.56 mmol/l), glycosylated haemoglobin (6.04 ± 1.17 vs 3.99 ± 0.44 %) and blood cholesterol concentration (2.15 ± 0.11 vs 1.83 ± 0.09 mmol/l) increased significantly ($p < 0.001$ and $p < 0.005$ for cholesterol) comparing to a group of healthy rats. No statistically significant differences were found in the remaining parameters when comparing these two groups. The parameters of oxidative phosphorylation were significantly ($p < 0.001$) decreased in the group with

Abstrakt

Uličná O., Zlatoš L., Holzerová J., Kvaszová E., Čársky J., Gvozdjaková A., Kucharská J., Bada V.:
Vplyv streptozotocínového diabetu vyvolaného v neonatálnom období na bioenergetiku mitochondrií pečene dospelých potkanov
Bratisl. lek. Listy, 100, 1999, č. 1, s. 5–11

Pozadie problému: Doterajšie experimentálne práce sledovali zmeny bioenergetiky mitochondrií pečene iba u zvierat s diabetes mellitus (DM) vyvolaným až v dospelosti. Chýbajú informácie o tom, ako sa pretrvávajúce DM z neonatálneho obdobia prejaví na bioenergetike mitochondrií pečene v dospelosti.

Cieľ: Cieľom bolo zistiť mieru kompenzácie DM a parametre oxidačnej fosforylácie u 3-mesačných potkanov s DM pretrvávajúcim z neonatálneho obdobia.

Metódy: DM sme vyvolali u potkanov—samcov kmeňa Wistar opakovaným intraperitoneálnym podaním streptozotocínu na 2. a 9. deň po narodení, zakaždým v dávke $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. V krvi sme stanovili koncentráciu glukózy, stupeň glykácie hemoglobínu, koncentráciu fruktóзамínu a koncentráciu cholesterolu a triacylglycerolov aj v pečenevom tkanive. Po izolácii mitochondrií z pečene sme merali parametre oxidačnej fosforylácie polarograficky, pomocou Clarkovej kyslíkovej elektródy.

Výsledky: V skupine 3-mesačných potkanov s DM pretrvávajúcim z neonatálneho obdobia sa oproti skupine zdravých potkanov významne ($p < 0,001$) zvýšila koncentrácia glukózy ($23,10 \pm 1,55$ vs. $8,34 \pm 0,56 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$), stupeň glykácie hemoglobínu ($6,04 \pm 1,17$ vs. $3,99 \pm 0,44$ %) aj ($p < 0,005$) koncentrácia cholesterolu ($2,15 \pm 0,11$ vs. $1,83 \pm 0,09 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) v krvi. V ostatných sledovaných ukazovateľoch sa medzi skupinou s DM a zdravými kontrolami nezistili významné rozdiely. Z parametrov oxidačnej fosforylácie sa v skupine s DM oproti kontrole ($p < 0,001$) významne znížili index respiračnej kontroly

The Pharmacobiochemistry Laboratory, The IIIrd Department of Internal Medicine, Medical Faculty, Comenius University, Bratislava, ¹The Institute of Pathophysiology, Medical Faculty, Comenius University, Bratislava, and ²The Institute of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Biochemistry, Medical Faculty, Comenius University, Bratislava

Address for correspondence: O. Uličná, RND, PhD, Farmakobiochemické laboratórium III. internej kliniky LFUK, Hlboká 7, 811 05 Bratislava, Slovakia.

Phone: +421.7. 396 974,

Farmakobiochemické laboratórium III. internej kliniky Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, ¹Ústav patologickej fyziológie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave a ²Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave

DM comparing to control group of healthy animals — the index of respiratory control (4.87 ± 0.25 vs 9.57 ± 0.34), the rate of oxygen consumption in the stage 3 in ADP presence (88.61 ± 4.62 vs 165.08 ± 4.5 natO.mg/protein/min) and phosphorylation rate (203.54 ± 7.26 vs 332.87 ± 7.39 nmol ATP.mg/protein/min) with NAD substrate glutamate. Similar trend was also seen with FAD substrate succinate. The index of oxidative phosphorylation ADP:O was not changed in both groups. *Conclusions:* In 3 months old rats with neonatally induced DM the development of steatosis was not observed and uncoupling of oxidative processes from phosphorylation did not appear. Energy production was sufficient enough for normal functions of the liver and to ensure all needs of the organism. (Tab. 4, Ref. 51.)

Key words: neonatal diabetes, liver, mitochondria, oxidative phosphorylation parameters.

Diabetes mellitus (DM) je spojený s komplexnou metabolickou poruchou, ktorá sa prejavuje výraznými zmenami metabolizmu všetkých troch hlavných živín, cukrov, tukov a bielkovín. Hlavným orgánom, ktorý podstatnou mierou zasahuje do ich metabolizmu, je pečeň. Nezastupiteľnosť funkcie pečene v intermediárnom metabolizme a jej úzky vzťah k metabolickým zmenám u diabetikov dlhodobo púta pozornosť diabetológov a hepatológov. Na základe klinickej praxe vyslovili Zschoch a Molnike (1963) tézu o existencii tzv. diabetickej hepatopatie. V popredí ich záujmu bol diabetický mikroangiopatický syndróm a nie intrahepatocelulárne organelové zmeny s následnými metabolickými poruchami. Toman a spol. (1981) týmto pojmom označili komplex morfológických, funkčných a metabolických zmien vznikajúci v pečeni diabetikov.

Niektoré z dôležitých biochemických procesov, ktoré determinujú poruchy metabolizmu pri diabete, prebiehajú v mitochondriách pečene. Mitochondrie pečene sú miestom tvorby ketolátok. Obsahujú enzýmy beta-oxidácie mastných kyselín, citrátového cyklu, premeny pyruvátu na acetyl CoA a nachádza sa v nich kľúčový enzým glukoneogenézy — pyruvátcarboxyláza. Vo vnútornej mitochondriálnej membráne sú lokalizované enzýmy dýchacieho reťazca spojeného s oxidačnou fosforyláciou.

Medzi prvými, ktorí zistili prítomnosť poruchy ultraštruktúry a oxidačnej fosforylácie mitochondrií v pečeni zvierat s experimentálnym diabetom, boli Hall a spol. (1960) a Harano a spol. (1972). Pozornosť v ďalších prácach sa zameriavala na to, či zmeny vyvolané diabetom progredujú a ako ich možno ovplyvniť (Grinblat a spol., 1988; Brignone a spol., 1991; Uličná a spol., 1995, 1997).

V posledných rokoch sa venuje veľká pozornosť štúdiu vzťahu diabetu a jeho komplikácií k tvorbe a pôsobeniu vysokoreaktívnych foriem kyslíka (Baynes, 1991; Jaing a spol., 1990; Sakurai a spol., 1990). Zvýšená tvorba voľných kyslíkových radikálov má za následok peroxidáciu lipidov bunkových membrán, čo spôsobí poruchu permeability a fluidity plazmatickej membrány, ako aj poruchu membrány vnútrobunkových organel, najmä endoplazmatického retikula a mitochondrií. Diabetes mellitus predstavuje stav zvýšeného oxidačného stresu. V tejto súvislosti sa študuje biotransformačný systém pečene (Afanasiev, 1994; Turecký, 1995) a mitochondriálna dysfunkcia (Kristal a spol., 1997 a, b).

Všetky doterajšie práce sledovali zmeny bioenergetiky pečene experimentálnych zvierat s diabetom vyvolaným až v dospie-

($4,87 \pm 0,25$ vs. $9,57 \pm 0,34$), rýchlosť spotreby kyslíka v stave 3 v prítomnosti ADP ($88,61 \pm 4,62$ vs. $165,08 \pm 4,5$ natO.mg.bielk. \cdot $l^{-1} \cdot min^{-1}$) a fosforylačná rýchlosť ($203,54 \pm 7,26$ vs. $332,87 \pm 7,39$ nmolATP.mg.bielk. \cdot $l^{-1} \cdot min^{-1}$) pri NAD substráte glutamáte. Podobný trend bol aj pri FAD substráte jantarane. Index oxidačnej fosforylácie ADP:O sa v sledovaných skupinách nezmenil.

Záver: U 3-mesačných potkanov s DM pretrvávajúcim z neonatálneho obdobia nevznikla steatóza pečene. K odpojeniu oxidačných procesov od fosforylácie nedošlo. Tvorba energie bola dostatočná na to, aby pečeň udržala svoje funkcie a zabezpečila potreby organizmu. (Tab. 4, lit. 51.)

Kľúčové slová: neonatálny diabetes, pečeň, mitochondrie, parametre oxidačnej fosforylácie.

losti. Cieľom našej práce bolo študovať bioenergetiku mitochondrií pečene dospelých potkanov so streptozotocínovým diabetom vyvolanom už v neonatálnom období.

Materiál a metódy

Pokusy sme robili na potkanoch—samcoch kmeňa Wistar. Nonarodeným potkanom sme na 2. a 9. deň života intraperitoneálne injikovali streptozotocín (Calbiochem) v dávke $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ hmotnosti tela. Streptozotocín sme tesne pred podaním rozpustili v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ citrátovom tlmivom roztoku s pH 4,5. Kontrolným zvieratám sme v uvedených dňoch postnatálneho života intraperitoneálne injikovali citrátový tlmivý roztok. Potkany sme od matky odstavili na 24. deň po narodení. Zvieratá sme krmili štandardnou Larsenovou stravou. Mali voľný prístup k potrave a pitnej vode.

Zvieratá sme koncom 3. mesiaca odvážili a usmrtili dekapitáciou. Pred usmrtením zvieratá nehladovali. Krv na biochemické vyšetrenia sme zachytili do skúmavky. Po odbere krvi sme okamžite vybrali pečeň, odvážili sme ju a prepláchli vo vychladenom fyziologickom roztoku.

Biochemické vyšetrenia: V krvi sme stanovovali koncentráciu glukózy (Lachema), glykovaného hemoglobínu (Flückinger a Winterhalter, 1976), fruktózamínu (Johnson a spol., 1982), cholesterolu (Bálint, 1962) a triacylglycerolov (Jover, 1963). V pečeno- v om tkanive sme stanovili hodnoty cholesterolu a triacylglycerolov.

Izolácia mitochondrií: Médium, ktoré sme použili na izoláciu mitochondrií, obsahovalo: $2,25 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ manitolu, $7,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ sacharózy, $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ EDTA, pH sme upravili na 7,4 (Palmer a spol., 1977). Izoláciu mitochondrií sme robili pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Pečeň sme rozstrihali v izolačnom médiu a zhomogenizovali v súprave teflón—sklo. Pripravili sme 10 % homogenát. Centrifugáciu sme robili v chladenej centrifúge. Po izolácii sme mitochondrie resuspendovali tak, aby obsah mitochondriálnych bielkovín bol 4—6 mg na 0,1 ml suspenzie. Koncentráciu bielkovín sme stanovili metódou podľa Lowryho a spol. (1951).

Meranie oxidačnej fosforylácie: Parametre oxidačnej fosforylácie sme určovali polarograficky, Clarkovou kyslíkovou elektródou pri $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Merania sme robili na oxygrafe Gilson 5/6 H. Inkubačné médium obsahovalo: $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ HEPES, $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 , $1,2 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ KCl, $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ EDTA, 2 % dextran, pH sme upravili na 7,2 (Rouslin a Millard, 1980).

Mitochondrie oxidovali NAD-substrát glutamát sodný alebo FAD-substrát jantaran sodný/rotenon. Ich výsledná koncentrácia v médiu bola $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$. Koncentrácia ADP pridávaného na stimuláciu dýchania bola 500 nanomolov.

Výsledky sme vyhodnotili Studentovým *t*-testom.

Výsledky

Hmotnosť tela a hmotnosť pečene sa významne znížila oproti kontrolným zvieratám (tab. 1). Koncentrácia glukózy v krvi a stupeň glykácie hemoglobínu u potkanov s diabetom boli významne zvýšené oproti kontrolnej skupine. Koncentrácia fruktózamínu bola zvýšená len mierne (tab. 2). U diabetických potkanov sa významne zvýšila koncentrácia cholesterolu v krvi. Koncentrácia triacylglycerolov v krvi a v pečeni a koncentrácia cholesterolu v pečeni sa u potkanov s diabetom zvýšili iba nevýznamne (tab. 3).

Tab. 1. Hmotnosť tela a pečene kontrolných a diabetických potkanov. Tab. 1. Body and liver weight of control and diabetic rats.

	Štatistické ukazovatele Statistical parameters	Kontrola Control	DM DM	p
Hmotnosť zvierat Body weight of animals (g)	n M ±SEM	13 259,23 9,57	16 204,37 13,5	<0,005
Hmotnosť pečene Body weight liver (g)	n M ±SEM	13 9,70 0,57	16 7,83 0,44	<0,01

Vysvetlivky: n – počet členov súboru, M - aritmetický priemer, ±SEM – stredná chyba priemeru, DM – diabetes mellitus, p – významnosť
Legend: n – number, M – arithmetic mean, ±SEM – standard error of mean, DM – diabetes mellitus, p – significance

Tab. 2. Koncentrácia glukózy, glykovaného hemoglobínu a fruktózamínu v krvi kontrolných a diabetických potkanov. Tab. 2. Concentration of blood glucose, glycosylated hemoglobin and fructosamine in control and diabetic rats.

	Štatistické ukazovatele Statistical parameters	Kontrola Control	DM DM	p
Krv Blood				
Glukóza Glucose (mmol.l ⁻¹)	n M ±SEM	13 8,34 0,56	16 23,10 1,55	<0,001
Glykovaný hemoglobín Glycated hemoglobin (%)	n M ±SEM	13 3,99 0,44	16 6,04 1,17	<0,001
Fruktózamín Fructosamine (mmol.l ⁻¹)	n M ±SEM	13 1,01 0,08	16 1,24 0,10	n.s.

Vysvetlivky pozri v tabulke 1. Legend see in Table 1.

Tab. 3. Koncentrácia cholesterolu a triacylglycerolov v krvi a v pečeni kontrolných a diabetických potkanov. Tab. 3. Concentration of cholesterol and triacylglycerols in blood and liver in control and diabetic rats.

	Štatistické ukazovatele Statistical parameters	Kontrola Control	DM DM	p
Cholesterol krv/blood Cholesterol (mmol.l ⁻¹)	n M ±SEM	13 1,83 0,09	16 2,15 0,11	<0,05
Triacylglyceroly krv/blood Triacylglycerols (mmol.l ⁻¹)	n M ±SEM	13 1,33 0,11	16 1,56 0,12	n.s.
Cholesterol pečeň/liver Cholesterol (mmol.kg ⁻¹)	n M ±SEM	13 5,15 0,17	16 5,73 0,44	n.s.
Triacylglyceroly pečeň/liver Triacylglycerols (mmol.kg ⁻¹)	n M ±SEM	13 7,81 0,80	16 9,23 0,84	n.s.

Vysvetlivky pozri v tabulke 1. Legend see in Table 1.

Ukazovatele oxidačnej fosforylácie v mitochondriách pečene sme merali za podmienok, že mitochondrie oxidovali buď NAD-substrát glutamát sodný alebo FAD-substrát jantaran sodný. V mitochondriách, ktoré boli izolované z pečeni diabetických potkanov, významne klesol index respiračnej kontroly (RCI), ktorý vyjadruje mieru integrity mitochondrií. Koeficient oxidačnej fosforylácie ADP:O bol rovnaký v skupine diabetických a kontrolných zvierat. Rýchlosť spotreby kyslíka v stave 3 počas stimulovaného dýchania s ADP sa u diabetických potkanov významne znížila oproti kontrolnej skupine. Rýchlosť spotreby kyslíka počas pokojového dýchania bez prítomnosti ADP v stave 4 sa v skupine diabetických potkanov v porovnaní s kontrolnou skupinou nezmenila. Rýchlosť tvorby ATP (fosforylačná rýchlosť) bola u diabetických potkanov znížená oproti kontrolnej skupine pri oboch použitých substrátoch (tab. 4).

Diskusia

Intraperitoneálne injikovanie 90 mg.kg⁻¹ streptozotocínu novonarodeným potkanom (na 2. deň života) iba v jednej dávke sa v dospelosti prejaví poruchou sekrécie inzulínu a hyperglykémiou iba pri záťaži glukózou. Za bazálnych podmienok mala koncentrácia glukózy a inzulínu v krvi fyziologické hodnoty (Blondel a spol., 1989). Príčina je v tom, že B-bunky pankreasu novonarodených potkanov majú na rozdiel od dospelých zvierat schopnosť čiastočnej regenerácie (Dutrillaux a spol., 1982). V našich predchádzajúcich pokusoch sme zistili, že ak sa podá rovnaké celkové množstvo streptozotocínu novonarodeným potkanom, ale rozdelené do dvoch dávok po 45 mg.kg⁻¹ hmotnosti tela injikovaných s týždňovým odstupom, vznikne u experimentálnych zvierat tr-

Tab. 4. Oxidačná fosforylácia v mitochondriách pečene kontrolných a diabetických potkanov.
Tab. 4. Oxidative phosphorylation in liver mitochondria in control and diabetic rats.

Substrát-glutamát Substrate-glutamate	Štatistické ukazovatele Statistical parameters	RCI (S_3, S_4^{-1})	ADP:O (nmolADP. nAtO $^{-1}$)	QO $_2(S_3)$ (nAtO.mg prot $^{-1}$.min $^{-1}$)	QO $_2(S_4)$ (nAtO.mg prot $^{-1}$.min $^{-1}$)	OPR (nmolATP.mg prot $^{-1}$.min $^{-1}$)
Kontrola Control	n M ±SEM	13 9,57 0,34	13 2,22 0,11	13 165,08 4,50	13 17,24 0,48	13 332,87 7,39
DM DM	n M ±SEM	16 4,87 0,25	16 2,31 0,09	16 88,61 4,62	16 17,91 0,62	16 203,54 7,62
	<p	0,001	n.s.	0,001	n.s.	0,001
Substrát-jantaran Substrate-succinate						
Kontrola Control	n M ±SEM	13 4,77 0,08	13 1,27 0,03	13 271,07 6,06	13 54,16 3,23	13 353,74 20,98
DM DM	n M ±SEM	16 2,39 0,08	16 1,33 0,04	16 128,77 9,61	16 53,80 3,49	16 172,86 16,39
	<p	0,001	n.s.	0,001	n.s.	0,001

Vysvetlivky: n – počet členov súboru, M – aritmetický priemer, ±SEM – stredná chyba priemeru, DM – diabetes mellitus, p – významnosť, RCI – respiračný kontrolný index, ADP:O – koeficient oxidačnej fosforylácie, QO $_2(S_3)$ – rýchlosť spotreby kyslíka mitochondriami pri stimulovaní s ADP (stav 3), QO $_2(S_4)$ – rýchlosť spotreby kyslíka v kľudovom stave (stav 4), OPR – fosforylačná rýchlosť

Legend: n – number, M – arithmetic mean, ±SEM – standard error of mean, DM – diabetes mellitus, p – significance, RCI – respiration control index, ADP:O – coefficient of oxidative phosphorylation, QO $_2(S_3)$ – rate of oxygen uptake by mitochondria stimulated with ADP (state 3), QO $_2(S_4)$ – rate of basal oxygen uptake by mitochondria (state 4), OPR – oxidative phosphorylation rate

valá hyperglykémia už v priebehu prvého mesiaca ich života (Zlatoš a spol., 1997 a, b). V ďalších mesiacoch postnatálneho života sa hyperglykémia ešte zvyšuje. Pre sledovanie vplyvu diabetu pretrvávajúceho z neonatálneho obdobia do začiatku dospelosti na bioenergetiku mitochondrií pečene sme použili tento model.

O prítomnosti diabetu u 3-mesačných potkanov s vyvolaným diabetom v neonatálnom období svedčí významne zvýšená koncentrácia glukózy a stupeň glykácie hemoglobínu oproti zdravým zvieratám rovnakého veku. Koncentrácia fruktózamínu u potkanov s DM sa zvýšila len veľmi mierne. Pri zvýšenej koncentrácii glukózy dochádza k neenzýmovej glykácii bielkovín a autooxidácii glukózy (Jaing a spol., 1990; Sakurai a spol., 1990). Tieto reakcie sú zdrojom tvorby vysoko reaktívnych foriem kyslíka. K vychýleniu rovnováhy v prospech prooxidačných procesov prispieva aj polyolová cesta metabolizmu glukózy (Kinoshita a spol., 1979; Srivastava a spol., 1986). K oxidačnému stresu pri streptozotocínovom diabete môžu prispievať aj ďalšie faktory. U zvierat so streptozotocínovým diabetom sa našli znížené aktivity antioxidantných enzýmov (Dohi a spol., 1988; Godin a spol., 1988; Wohaeib a Godin, 1987) aj znížená tkanivová koncentrácia kyseliny L-askorbovej, ktorá má významnú fyziologickú antioxidantnú úlohu v organizme (Yew, 1983).

Nedostatok inzulínu moduluje metabolizmus lipidov. Pri diabete dochádza k zvýšeniu mobilizácie lipidov a môže vzniknúť hyperlipoproteinémia a hypercholesterolémia (Howar, 1987; Betteridge, 1989; Taskinen, 1990). Zvýšenú koncentráciu cholesterolu

u v krvi sme našli aj v našom pokuse. Mastné kyseliny sa vo zvýšenej miere privádzajú do pečene, kde sa ich časť ukladá, časť sa transportuje do krvi a časť sa oxiduje. Koncentráciu triacylglycerolov a cholesterolu v pečeni sme našli zvýšenú len veľmi mierne. U 3-mesačných zvierat s diabetom vyvolaným v neonatálnom období steatóza pečene nevznikla.

Pri diabetes mellitus je veľká pravdepodobnosť oxidačného poškodenia bunkových membrán a organel v dôsledku oxidačného stresu. Voľné radikály narušujú lipidové membrány, ale vyvolávajú aj mutácie mitochondriálnej DNK, čo môže mať za následok pokles energetického výkonu mitochondrií (Kristal a spol., 1994 b). Výsledky experimentálnych prác svedčia o existencii intracelulárneho a/alebo intramitochondriálneho oxidačného stresu aj v hepatocytoch diabetických zvierat (Kristal a spol., 1997 a, b).

Spojenie diabetu s poškodením respiračnej funkcie mitochondrií pečene, srdca a obličiek sa u diabetických zvierat študuje pri rôznych modeloch experimentálneho diabetu. Údaje o tom, ako ovplyvní vyvolanie diabetu v neonatálnom období oxidačnú fosforyláciu u dospelého zvierata, chýbajú.

V mitochondriách izolovaných z pečene 3-mesačných potkanov s diabetom vyvolaným v neonatálnom období sme zistili zníženú kapacitu dýchacieho reťazca a zníženú fosforyláciu. Sú to podobné zmeny, aké vznikajú v pečeni potkanov s diabetom vyvolaným až v dospelosti (Harano a spol., 1972; Uličná a spol., 1996; Kristal a spol., 1997 a). Svedčí o tom zníženie rýchlosti spotreby kyslíka v stave 3 pri stimulovanom dýchaní s ADP, pri

oboch použitých substrátoch: NAD-substráte glutamáte sodnom i FAD-substráte jantarane sodnom. Zníženiu rýchlosti oxidácie zodpovedalo zníženie rýchlosti tvorby ATP. Rýchlosť, akou mitochondriálna suspenzia pri dostatku substrátu a ADP spotrebováva kyslík, je citlivým meradlom funkcie dýchacieho reťazca. Oxidácia a fosforylácia sú v dobre fungujúcej mitochondrii tak tesne spojené, že k transportu elektrónov v dýchacom reťazci dochádza len vtedy, ak sa fosforyluje ADP (stav 3). Mitochondriálny metabolizmus je regulovaný tak jemne, že v pokojovom stave, keď nie je prítomné ADP (stav 4), je rýchlosť tvorby kyselíka veľmi malá.

Index respiračnej kontroly (RCI), ktorý je mierou integrity mitochondrií, bol v mitochondriách diabetických potkanov významne znížený. Približne rovnaké zníženie RCI sa zistilo u dospelých potkanov s aloxánovým diabetom (Harano a spol., 1972) a u dospelých potkanov so streptozotocínovým diabetom, ktorým sa podával inzulín (Uličná a spol., 1996). Ukazuje sa, že k zníženiu RCI dôjde v krátkom čase — o 3 dni (Harano a spol., 1972) alebo o 7 dní (Uličná a spol., 1996) po vyvolaní experimentálneho diabetu, pravdepodobne ako následok akútnej krízy spojenej so zvýšenou tvorbou ketolátok, ktorých tvorba je lokalizovaná v mitochondriách pečene.

Pomer ADP:O, ktorý kvantitatívne odráža spojenie tvorby ATP s transportom elektrónov, bol u 3-mesačných potkanov s neonatálnym diabetom rovnaký ako u zvierat kontrolnej skupiny. Zníženie indexu ADP:O, ktoré sa zistilo pri niektorých modeloch experimentálneho diabetu, poukazuje na určitú mieru odpojenia oxidácie od fosforylácie.

Kristal a spol. (1997 a) zistili zníženú transkripčnú kapacitu v mitochondriách diabetických potkanov. Pokles transkripčnej kapacity mitochondrií koreloval s výškou koncentrácie lipidov a ketolátok v krvi. Čím vyššia bola lipémia a koncentrácia ketolátok, tým bola celková transkripčná kapacita mitochondrií diabetických potkanov nižšia. Represiu mitochondriálnej transkripcie vyvoláva oxidačný stres (Kristal a spol., 1994 a, b, 1997 b; Crawford a spol., 1997). Mitochondriálna dysfunkcia a zníženie ADP:O sa môže vyvíjať aj v súvislosti s defektom P-centra Q-cyklu v komplexe III dýchacieho reťazca (Kristal a spol., 1997 a). Toto je v súlade so známou skutočnosťou, že ubichinol je dôležitou zložkou dýchacieho reťazca a významným antioxidantom. Práve reakcia medzi ubichinolom a cytochrómom b v Q-cykly je zdrojom tvorby superoxidového radikálu v dýchacom reťazci (Nohl a Jordan, 1986; Kristal a spol., 1997 a). Záleží na tom, či mitochondriálna Mn-superoxiddismutáza, ktorá je lokalizovaná vo vnútornej membráne mitochondrií, ale kódujú ju jadrové gény, stačí dismutovať tvorený superoxid. Ak je jeho tvorba vyššia ako scavengerová kapacita tohto enzýmu, zvýšená produkcia superoxidu ešte zvyšuje oxidačný stres navodený diabetom.

Výsledky ukázali, že u potkanov s vyvolaným neonatálnym diabetom pretrvávajúcím do dospelosti, bol znížený index RCI, znížená rýchlosť spotreby kyselíka v stave 3 a znížená tvorba ATP, ale nedošlo k odpojeniu oxidačných procesov v dýchacom reťazci od fosforylácie, o čom svedčí nezmenená hodnota koeficientu oxidačnej fosforylácie ADP:O.

Na určitý stupeň antioxidačnej ochrany mitochondrií pečene pri DM poukazuje práca Sukalskej a spol. (1993). Zistili, že mitochondrie izolované z diabetických potkanov boli in vitro menej vnímavé na oxidačné poškodenie ako mitochondrie zdravých zvierat. V mitochondriách diabetických potkanov zároveň našli až 7-krát vyššiu koncentráciu alfatokoferolu. Usudzujú, že príčinou je zmena v metabolizme alebo ukladaní alfatokoferolu u diabetických potkanov. Lipolýza spojená s inzulín-deficitným stavom môže viesť k mobilizácii alfatokoferolu z tukového tkaniva a jeho transportu do pečene. Tukové tkanivo aj pečeň sú dôležité miesta ukladania alfatokoferolu (Bjerneboe a spol., 1986). Naproti tomu v mitochondriách izolovaných z obličiek diabetických potkanov pri tých istých experimentálnych podmienkach sa nenašli zvýšené koncentrácie alfatokoferolu a ich citlivosť na oxidačné poškodenie in vitro bola oproti zdravým zvieratám nezmenená. Niektoré práce ukazujú, že vitamín E chráni iba pred peroxidáciou lipidov, nie však pred poškodením transkripčnej funkcie mitochondrií oxidačným stresom (Sato a spol., 1990; Niku a spol., 1991; Kristal a spol., 1994 b).

Výsledky našej práce ukázali, že mitochondrie pečene 3-mesačných potkanov s diabetom pretrvávajúcím z neonatálneho obdobia majú znížený index respiračnej kontroly, zníženú rýchlosť spotreby kyselíka v stave 3 a zníženú rýchlosť tvorby ATP. K odpojeniu oxidačných procesov od fosforylácie nedošlo, lebo hodnoty koeficientu oxidačnej fosforylácie ADP:O boli u 3-mesačných diabetických potkanov rovnaké ako u kontrolných zvierat v rovnakom veku. Ukazuje sa, že celková tvorba energie v mitochondriách pečene 3-mesačných diabetických potkanov s neonatálnym diabetom je stále dostatočná na udržanie funkcií pečene.*

Literatúra

- Afanasiev I.B.:** Oxygen radical production and lipid peroxidation in microsomes. *Free Rad. Biol. Med.*, 16, 1994, s. 7.
- Baynes J.W.:** Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, 40, 1991, s. 405—412.
- Bálint P.:** Klinikai laboratórium diagnostika. Budapest, Egészségügyi Kiadó, 1962, 599 s.
- Betteridge D.J.:** Lipids, diabetes, and vascular disease: the time to act. *Diabetic. Med.*, 6, 1989, č. 3, s. 195—218.
- Bjerneboe A., Bjerneboe G.E.A., Bodd E., Hagen B.F., Kveseth N., Drevon C.A.:** Transport and distribution of alpha-tocopherol in lymph, serum and liver cells in rats. *Biochim. Biophys. Acta*, 889, 1986, s. 310—315.
- Blondel O., Bailbé D., Portha B.:** Relation of insulin deficiency to impaired insulin action in DIDDM adults rats given streptozotocin as neonates. *Diabetes*, 38, 1989, s. 610—617.
- Brignone S.A., deBrignone C.M.C., DeMignone I.R., Ricci C.R., Sussemihl M.C., Rodrigues R.R.:** Improving effects obtained by the ovariectomy or treatment with fenoxifen of female diabetic rats over the function and enzyme activities of liver mitochondria. *Horm. Metab. Res.*, 23, 1991, s. 51—61.
- Crawford D.R., Wang Y., Schools G.P., Kochheiser J., Davies K.J.A.:** Down-regulation of mammalian mitochondrial RNAs during oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.*, 22, 1997, s. 551—559.
- Dohi T., Kawamura K., Morita K., Okamoto H., Tsujimoto A.:** Alterations of the plasma selenium concentrations and the activities of tissue

*Technická spolupráca: Eftimová E., Butašová L., Opálená D., Ing. Benko E.
Grant č. 1/5158/98, 1/4112/97

- peroxide metabolism enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Horm. Metabol. Res.*, 20, 1988, s. 671–675.
- Dubrillaux M.C., Portha B., Rozé C., Hollaande E.:** Ultrastructural study of pancreatic B cell regeneration in membrane rats after destruction by streptozotocin. *Virchows. Arch. (Cell. Pathol.)*, 39, 1982, s. 173–185.
- Flückiger R., Winterhalter K.H.:** In vitro synthesis of hemoglobin A_{1c}. *FEBS Lett.*, 71, 1976, č. 1, s. 356–360.
- Gillery P., Monboisse J.C., Maquart F.X., Borel S.P.:** Does oxygen free radical increased formation explain long term complications of diabetes mellitus. *Med. Hypotheses*, 29, 1989, s. 47–50.
- Godin D.V., Wohaieb S.A., Garanett M.E., Gouneniouk A.D.:** Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. *Mol. Cell. Biochem.*, 84, 1988, s.223–231.
- Golberg R.B.:** Lipid disorders in diabetes. *Diabetes Care*, 4, 1981, s. 561–577.
- Grinblat L., Bedetti C.D., Stoppani A.O.M.:** Calcium transport and energy coupling in diabetic rat liver mitochondria. *Biochem. Int.*, 17, 1988, s. 329–335.
- Hall J.C., Sordahl L.A., Stefko P.L.:** The effect of insulin on oxidative phosphorylation in normal and diabetic mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 235, 1996, s. 1536–1539.
- 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.
- Howard B.V.:** Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. *Minireview. J. Lipids Res.*, 28, 1987, s. 613–628.
- 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.
- Johnson W.T., Evans G.W.:** Effects of the interrelationship between dietary protein and minerals of tissue content of trace metals in streptozotocin-diabetic rats. *J. Nutr.*, 114, 1984, s. 180–190.
- Jover A.:** Technique for the determination of serum glycerides. *J. Lipid Res.*, 4, 1963, s. 228–230.
- Kinoshita J.H., Fukoshi S., Kador P., Merola L.O.:** Aldose reductase in diabetic complications of the eye. *Metabolism*, 28, 1979, s. 462–468.
- Kristal B.S., Chen,S.S., Yu B.P.:** Sensitivity of mitochondrial transcription to different free radical species. *Free Rad. Biol. Med.*, 16, 1994 a, s. 323–329.
- Kristal B.S., Jackson Ch.T., Chung H.Y., Hatsuda M., Ngeujen H.D., Yu B.P.:** Defects of center P underlie diabetes-associated mitochondrial dysfunction. *Free Rad. Biol. Med.*, 22, 1997 a, s. 823–833.
- Kristal B.S., Koopmans S.J., Jackson CH.T., Ikeno Y., Park B.J., Yu B.P.:** Oxidant-mediated repression of mitochondrial transcription in diabetic rats. *Free Rad. Biol. Med.*, 22, 1997 b, s. 813–822.
- Kristal B.S., Park B.J., Yu B.P.:** Antioxidants reduce peroxylmediated inhibition of mitochondrial transcription. *Free Rad. Biol. Med.*, 16, 1994 b, s. 653–660.
- 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.
- Niki E., Yamamoto Y., Komuro E., Sato K.:** Membrane damage due to lipid oxidation. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 53, 1991, s. 2015–2055.
- Nohl H., Jordan W.:** The mitochondrial site of superoxide generation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 138, 1986, s. 533–539.
- Oberley L.W.:** Free radicals and diabetes. *Free Rad. Biol. Med.*, 5, 1988, s. 113–124.
- Palmer J.W., Tandler B., Hoppler L.C.:** Biochemical properties sub-sarcolemal and interfibrillar mitochondria isolated from cardiac muscle. *J. Biol. Chem.*, 252, 1977, s. 8731–8739.
- Ross D., Albano E., Moldeus P.:** The generation and fate of glutathionyl radicals in biological systems. S. 17–20. In: Poli G., Cheeseman K.H., Dianzini M.U., Slater T.F. (Eds.): *Free radicals in liver injury*. Oxford—Washington—New York, IRL Press 1985.
- Rouslin W., Millard R.W.:** Canine myocardial ischemia. Defect in mitochondrial electron transfer complex. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 12, 1980, s. 639–645.
- Sakurai T., Sugioka K., Nakano M.:** O₂⁻ generation and lipid peroxidation during the oxidation of a glycated polypeptide, glycated polylysine in the presence of iron-ADP. *Biochim. Biophys. Acta*, 1043, 1990, s. 27–33.
- Sato K., Niki E., Shimasaki H.:** Free radical-mediated chain oxidation of low density lipoprotein and its synergistic inhibition by vitamin E and C. *Arch. Biochem. Biophys.*, 279, 1990, s. 403–405.
- Saxena A.K., Srivastava P., Kale R.K., Baquer N.Z.:** Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. Effect of vanadate. *Biochem. Pharmacol.*, 45, 1993, s. 539–542.
- Srivastava S.K., Ansari N.H., Hair G.A., Jaspán J., Rao M.B., Das B.:** Hyperglycaemia-induced activation of human erythrocyte aldose reductase and alterations in kinetic properties. *Biochim. Biophys. Acta*, 870, 1986, s. 302–311.
- Sukalski K.A., Pinto K.A., Berntson J.L.:** Decreased susceptibility of liver mitochondria from diabetic rats to oxidative damage and associated increase in alpha-tocopherol. *Free Rad. Biol. Med.*, 14, 1993, s. 57–65.
- Taskinen M.R.:** Hyperlipidaemia in diabetes. *Baill. Clin. Endocrin. Metab.*, 4, 1990, 4, s. 743–790.
- Toman R., Zeman V., Hanika S., Zelenková J., Butková J.:** Diabetická hepatopatie. *Prakt. Léč.*, 61, 1981, s. 856–861.
- Turecký L.:** Biotransformačný systém pečene a diabetes mellitus. Bratislava, LFUK 1995, 173 s.
- Uličná O., Čížová M., Kolesár P., Volkovová K., Cibulová L., Čársky J., Ondrejka P.:** Bioenergetika pečeneových mitochondrií pri experimentálnom diabetes mellitus po podávaní ramiprilu. *Bratisl. lek. Listy*, 98, 1997, č. 12, s. 687–694.
- Uličná O., Uličná L., Ištvanová B., Volkovová K.:** The influence of enalapril on energetic liver metabolism of diabetic rats. *Europ. J. Clin. Med.*, 6, 1995, Suppl. 1, s. 123.
- Uličná O., Volkovová K., Ištvanová B.:** Bioenergetika mitochondrií pečene potkana pri experimentálnom inzulínne nezávislom diabete. *Bratisl. lek. Listy*, 97, 1996, č. 10, s. 619–624.
- Wohaieb S.A., Godin D.V.:** Alterations in free radical tissue-defense mechanism in streptozotocin-induced diabetes rat: Effect of insulin treatment. *Diabetes*, 36, 1987, s. 1014–1018.

Wolff S.P.: Diabetes mellitus and free radicals. *Brit. Med. Bull.*, 49, 1993, s. 642—652.

Yew M.S.: Effect of streptozotocin diabetes on tissue ascorbic acid and dehydroascorbic acid. *Horm. Metabol. Res.*, 15, 1983, s. 158.

Zlatoš L., Gvozdjaková A., Kucharská J., Kvaszová E., Holzerová J., Kováčová M., Uličná O., Bada V.: Some bioenergetic characteristics of cardiac mitochondria in young and adult diabetic rats. *J. Med. Cell. Cardiol.*, 29, 1997 a, s. A105.

Zlatoš L., Gvozdjaková A., Kucharská J., Kvaszová E., Holzerová J., Kováčová M., Uličná O., Bada V.: Some characteristics of cardiac mitochondrial respiration and the energy production in young and adult diabetic rats. *J. Kardiol.*, 2, 1997 b, s. 139.

Zschoch H., Monike G.: Klinische Untersuchungen und bioptische Leberbefunde bei Diabets mellitus. *Z. inn. Med.*, 18, 1963, s. 165—170.

Do redakcie došlo 14.4.1998.

LIST EDITOROVI

Vážený pán profesor!

Prijmite úprimné a srdečné poďakovanie za uverejnenie zdravice pri príležitosti mojich 70. narodenín v Bratislavských lekárskejších listoch. Od vstupu na LFUK v Bratislave sa môj osud spájal s týmto časopisom a nielen že som v BLL publikoval, ale dlhé obdobie som bol aj členom redakčnej rady. Ako ste to naznačili, funkciu člena redakčnej rady som nebral formálne, ale snažil som sa na každom mieste prispievať k dobrej úrovni tohto časopisu. Opakovane som vystúpil na obranu BLL aj na Vedeckom kolégiu SAV. Z prác, ktoré som publikoval v BLL, boli z dvoch prevzaté abstrakty do *Blood* a pri niektorých prácach bola aj dobrá citovateľnosť v popredných odborných časopisoch. Pri svojich zahraničných cestách som sa vždy zaujímal v knižniciach, či sa tam nachá-

dza aj BLL. Naplňa ma radosťou, že dlhé roky som patril medzi tých členov redakčného kolektívu, ktorí sa poctivo zúčastňovali na všetkých zasadaniach redakčnej rady. Vyplývalo to aj z úcty k prof. Ondrejčikovi a zo záujmu o BLL. Časopis BLL som vždy chápal na pozadí histórie medicíny na Slovensku, ako súčasť kultúry tohto národa a intelektuálnej úrovne medicínsko-biologického potenciálu. Aj naďalej treba viesť zápas o zachovanie existencie a vysokej odbornej a vedeckej úrovne Bratislavských lekárskejších listov.

Nech sa Vám i redakčnému kolektívu dobre darí pri realizovaní cieľov spojených s BLL a našou medicínou.

Priateľsky a s úctou
J. Štefanovič