

Звягина Т.С., Горбенко Н.И., Бориков А.Ю.

Влияние таурина на биоэнергетические процессы митохондрий сердца крыс с синдромом инсулинорезистентности

Государственное учреждение «Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского Национальной академии наук Украины», ул. Артёма, д. 10, г. Харьков, Украина, 61002

Исследовано влияние таурина на функциональную активность митохондрий сердца крыс с синдромом инсулинорезистентности, индуцированным высокофруктозной диетой. Установлено, что таурин тормозит развитие инсулинорезистентности и интолерантности к углеводам, накопление висцерального жира и увеличение прироста массы тела. Показано, что использование таурина у животных с синдромом инсулинорезистентности способствует снижению митохондриальной дисфункции в сердце, нормализуя скорость АДФ-стимулированного дыхания в метаболическом состоянии 3 в присутствии НАД-зависимых субстратов. Полученные результаты могут указывать на восстановление процессов окислительного фосфорилирования на уровне комплекса I электрон-транспортной цепи митохондрий сердца при синдроме инсулинорезистентности. Выявленные фармакологические свойства таурина свидетельствуют о перспективности его применения с целью профилактики и лечения сердечно-сосудистой патологии при метаболическом синдроме.

Ключевые слова: таурин, инсулинорезистентность, митохондрии

Для корреспонденции: Звягина Татьяна Сергеевна, e-mail: tszvyagina@mail.ru

Для цитирования: Звягина Т.С., Горбенко Н.И., Бориков А.Ю. Влияние таурина на биоэнергетические процессы митохондрий сердца крыс с синдромом инсулинорезистентности. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; 60(2): 57–62

Конфликт интересов: нет конфликта интересов.

Поступила 24.11.14

Zvyagina T.S., Gorbenko N.I., Borikov A.Y.

Taurine influence on heart mitochondrial bioenergy processes of rats with insulin resistance syndrome

State institution «V. Danilevsky institute for endocrine pathology problems National academy of medical sciences of Ukraine», 10, Artyoma Str., 61002, Kharkov, Ukraine

Taurine impact on heart mitochondria functional activity of rats with metabolic syndrome induced by high fructose diet was investigated. It has been established that taurine suppresses insulin resistance and carbohydrates intolerance, visceral fat accumulation and body mass gain increase. It was shown taurine application in animals with insulin resistance syndrome favours mitochondrial dysfunction decrease in heart due to normalization of ADF-stimulated respiration rate in the metabolic state 3 in NAD-dependended substrates presence. Given results can indicate oxidative phosphorylation processes restoration at the complex I of heart mitochondrial electron transport chain under insulin resistance syndrome. Pharmacological properties of taurine that indicate its application advisability to cardiovascular pathology and metabolic syndrome prevention and treatment were detected.

Keywords: taurine, insulin resistance, mitochondria

For correspondence: Zvyagina T.S., e-mail: tszvyagina@mail.ru

For citation: Zvyagina T.S., Gorbenko N.I., Borikov A.Y. Taurine influence on heart mitochondrial bioenergy processes of rats with insulin resistance syndrome. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (2): 57–62. (in Russ).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received 24.11.14

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания остаются основной причиной инвалидизации и смерти населения в большинстве развитых стран мира. Известно, что синдром инсулинорезистентности или метаболический синдром (МС) в 5 раз увеличивает риск развития кардиоваскулярных патологий по сравнению с лицами без признаков данного синдрома. МС характеризуется комбинацией нескольких факторов кардиометаболического риска, включая инсулинорезистентность, атерогенную дислипидемию, абдоминальное ожирение и гипертензию [1, 2].

Установлено, что важную роль в патогенезе инсулинорезистентности играет митохондриальная дисфункция, которая развивается в результате чрезмерного поступления энергетических субстратов на фоне низкой физической активности и проявляется в снижении биогенеза митохондрий, их окислительной способности и увеличении генерации активных форм кислорода (АФК). Последние, в свою очередь, способствуют усугублению дисфункции митохондрий, повреждению биомолекул, что приводит к нарушению основных метаболических путей, включая цепь переноса электронов. Митохондриальная ДНК является одной из наиболее уязвимых мишеней для супероксид аниона и других радикалов кислорода, что приводит к эпигенетическим модификациям и синтезу мутантных белков. Кроме того, окислительный стресс, обусловленный избыточной продукцией АФК, индуцирует инсулинорезистентность и активирует провоспалительные пути, что способствует развитию атеросклероза и кардиомиопатии [1, 3—8].

Восстановление функции и окислительно-восстановительного баланса митохондрий, может быть одним из направлений восстановления чувствительности к инсулину и коррекции нарушений, ассоциированных с МС. В связи с этим представляется перспективным использование природной аминокислоты таурина, выполняющей важную роль в поддержании буферной ёмкости митохондрий и обладающей выраженными антиоксидантными свойствами.

Таурин в химическом отношении является аминокислотой, которая присутствует в свободном состоянии во всех тканях и органах человека и животных [9, 10]. Установлено, что таурин выполняет ряд важных биологических функций, а именно: принимает участие в конъюгации жёлчных кислот, регулирует обмен кальция, калия и натрия, проявляет гипогликемические, противовоспалительные и антиоксидантные свойства, препятствует развитию ожирения, улучшает функцию сосудов [11—13]. Следует отметить, что таурин обеспечивает оптимальный уровень рН для работы ферментов митохондриального матрикса, а также образует конъюгаты с остатками уридина

в wobble положении тРНК (5-таурометилуридин). Показано, что при уменьшении его содержания в митохондриях снижается дыхательная функция, генерация АТФ, что сопровождается увеличением продукции АФК [14, 15].

Цель исследования — изучение влияния таурина на функциональную активность митохондрий сердца крыс с синдромом инсулинорезистентности.

Методика

Самцов крыс Вистар ($n = 18$) массой 200—250 г содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении и режиме питания, рекомендованном для данного вида животных. Модель МС воспроизводили хроническим (в течение 2 мес.) поступлением фруктозы с питьевой водой в концентрации 200 г/л [16]. Исследования проводили в соответствии с национальными «Общими этическими принципами экспериментов на животных», что соответствует приказу МОЗ Украины № 944 «Порядок проведения доклинического изучения лекарственных средств» от 14.12.2009 г., а также требованиями GLP [17].

Таурин применяли в виде водной суспензии в дозе 100 мг на кг массы тела на протяжении 8 нед., начиная с первого дня эксперимента. Суспензию вводили внутривентрикулярно при помощи зонда. Контрольная группа по аналогичной схеме получала растворитель (вода). Таким образом, в исследовании было сформировано три экспериментальные группы: 1 — интактный контроль; 2 — высокофруктозная диета (ВФД) + растворитель; 3 — ВФД + таурин.

Митохондрии сердца крыс получали методом дифференциального центрифугирования при 7000 г в среде, содержащей 10 мМ Трис-НСl буфера рН 7.4, 250 мМ сахарозы, 10 мМ ЭДТА и 0,5% БСА. Дыхание митохондрий регистрировали с помощью закрытого кислородного электрода Кларка в кювете с постоянной температурой (30 С) в реакционной среде инкубации следующего состава: 150 мМ сахараза, 75 мМ КCl, 10 мМ KH_2PO_4 , 2 мМ MgCl_2 , 10 мМ Трис-НСl (рН 7.4). АДФ добавляли в среду инкубации в концентрации 200 мкМ, субстраты окисления: глутамат + малат — 5 мМ, сукцинат — 8 мМ. По кривым поглощения кислорода в метаболических состояниях 3 (V3) и 4 (V4) по Чансу рассчитывали скорость дыхания митохондрий, и дыхательный контроль как отношение $V3/V4$ [18]. Активность цитохром С-оксидазы определяли спектрофотометрическим методом [19]. Содержание белка в суспензии митохондрий определяли методом Бредфорда [20].

В конце эксперимента гомеостаз глюкозы оценивали во время внутрибрюшинного теста толерантности к глюкозе (ВБТТГ) (3 г глюкозы на кг массы тела), чувствительность к инсулину определяли с помощью внутрибрюшинного теста толерантности к инсулину (ВБТТИ) (инсулин 0,5 ед. на кг массы тела, глюкоза 2 г на кг через 10 мин после введения инсулина [21]. Содержание глюкозы в крови определяли глюкозооксидазным методом с помощью ферментативного анализатора глюкозы «Эксан-Г».

Площади под гликемическими кривыми (ППК) при проведении ВБТТГ и ВБТТИ рассчитывали с помощью компьютерной программы «Mathlab».

Среди интегральных показателей определяли прирост массы тела и относительную массу висцерального жира, которую рассчитывали как сумму эпигонадального, эпинефрального и мезентерального жира.

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики с применением критерия множественного сравнения Ньюмена—Кейлса [22]. Результаты представлены в виде средней (М) и ошибки средней (SEM). Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Известно, что усиленная утилизация фруктозы печенью приводит к активации углеводного и липидного метаболизма, а именно к развитию гиперинсулинемии, инсулинорезистентности, толерантности к глюкозе, нарушению в балансе окисления и этерификации жирных кислот [23].

В результате проведенных исследований было верифицировано развитие инсулинорезистентности и интолерантности к углеводам у животных, содержащихся в условиях хронического поступления фруктозы, что подтверждалось более высокими показателями площади под соответствующими гликемическими кривыми относительно интактного контроля (табл. 1).

Полученные данные совпадают с результатами других исследований, касающихся развития инсулинорезистентности, индуцированной хроническим введением фруктозы. Возможным механизмом ее возник-

новения считается снижение активности глюкокиназы, а также активация глюкозо-6-фосфатазы — ферментов, которые регулируют метаболизм углеводов в печени [24], а также нарушение ранних этапов в трансдукции инсулинового сигнала, в частности процессов фосфорилирования рецептора к инсулину и субстрата инсулинового рецептора [25].

Установлено, что двухмесячное применение таурина улучшает толерантность к углеводам и чувствительность к инсулину у крыс с МС, подтверждением чему было значительное снижение площади под гликемическими кривыми при проведении ВБТТГ и ВБТТИ по сравнению с показателями для группы, получавшей плацебо (табл. 1).

Одним из компонентов метаболического синдрома является ожирение, которое тесно связано с инсулинорезистентностью [26]. Известно, что фруктоза, в отличие от глюкозы, не стимулирует продукцию инсулина и лептина — ключевых гормонов, которые играют важную роль в длительной регуляции энергетического гомеостаза. Вследствие хронического применения больших доз фруктозы нарушается инсулиновый ответ на приём пищи, а также снижается продукция лептина, что может привести к чрезмерному поступлению энергии и, как следствие, увеличению массы тела [27].

Установлено, что хроническое применение фруктозы сопровождается увеличением относительной массы висцерального жира более чем в два раза, что способствует развитию инсулинорезистентности (табл. 1).

При оценке массы тела экспериментальных животных было выявлено значительное увеличение данного показателя при содержании крыс на ВФД, что, вероятно, является результатом увеличения массы жировой ткани (табл. 1).

Применение таурина предотвращало повышение прироста массы тела, в частности, за счет снижения массы висцерального жира, что коррелирует с улучшением чувствительности к инсулину у животных с МС (табл. 1).

Таблица 1

Влияние таурина на показатели гомеостаза глюкозы, прирост массы тела и относительную массу висцерального жира у крыс с МС, индуцированным ВФД (n = 6, М ± SEM)

Группа	ППК при проведении ВБТТГ, ммоль/л мин	ППК при проведении ВБТТИ, ммоль/л мин	Прирост массы тела, %	Относительная масса висцерального жира, %
Интактный контроль	683,1 ± 27,3	379,9 ± 34,2	12,24 ± 2,05	1,67 ± 0,19
ВФД + растворитель	1043,7 ± 82,5 *	547,1 ± 18,8 *	21,19 ± 1,63 *	3,95 ± 0,31 *
ВФД + таурин	695,5 ± 18,2 #	426,7 ± 38,7 #	13,54 ± 2,87 #	2,37 ± 0,27 * #

Примечание. * — статистически значимые отличия в сравнении с данными для группы «интактный контроль», $p \leq 0,05$; # — статистически значимые отличия в сравнении с данными для группы «ВФД + плацебо», $p \leq 0,05$.

Влияние таурина на скорость дыхания (в присутствии малата и глутамата) изолированных митохондрий сердца крыс с МС, индуцированным ВФД (n = 6, M ± SEM)

Группа	V ₄ , натом кислорода/мин/мг белка	V ₃ , натом кислорода/мин/мг белка	V ₃ /V ₄
Интактный контроль	14,24 ± 1,20	82,60 ± 7,48	5,83 ± 0,35
ВФД + растворитель	14,44 ± 1,18	66,21 ± 5,00 *	4,63 ± 0,25 *
ВФД + таурин	14,51 ± 1,26	76,04 ± 3,97 #	5,38 ± 0,32 #

Примечания аналогичны табл. 1.

Влияние таурина на скорость дыхания (в присутствии сукцината) изолированных митохондрий сердца крыс с МС, индуцированным ВФД (n = 6, M ± SEM)

Группа	V ₄ , натом кислорода/мин/мг белка	V ₃ , натом кислорода/мин/мг белка	V ₃ /V ₄
Интактный контроль	76,85 ± 5,44	177,23 ± 14,53	2,35 ± 0,18
ВФД +	80,53 ± 4,09	171,19 ± 13,96	2,12 ± 0,06
ВФД + таурин	80,51 ± 5,57	191,70 ± 11,81	2,40 ± 0,10

Примечания аналогичны табл. 1.

Известно, что в условиях излишнего поступления энергии параллельно с инсулинорезистентностью и ожирением развивается митохондриальная дисфункция, связанная с метаболическими осложнениями, в том числе кардиоваскулярными патологиями [28, 29]. Функциональное состояние митохондрий оценивали по скорости дыхания (поглощения кислорода суспензией органелл) в присутствии субстратов, окисляющихся НАД-зависимыми (глутамат + малат) или ФАД-зависимыми (сукцинат) дегидрогеназами.

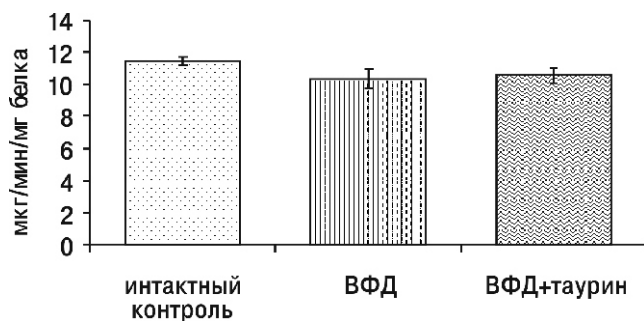
При определении показателей дыхания изолированных митохондрий сердца в присутствии глутамата и малата было установлено уменьшение скорости АДФ-стимулированного дыхания (V₃) и снижение коэффициента дыхательного контроля в митохондриях животных, которых содержали на ВФД, по сравнению с интактным контролем (табл. 2). Это свидетельствует о нарушении регуляции дыхательной цепи энергетическим состоянием клетки, которое выража-

ется в разобщении дыхания и окислительного фосфорилирования, что является одним из основных маркеров митохондриальной дисфункции. В то же время, в условиях применения сукцината в качестве субстрата дыхания, скорость поглощения кислорода в состояниях 3 и 4, а также дыхательный контроль митохондрий животных, получавших ВФД, не отличались от показателей контрольной группы (табл. 3).

Известно, что сукцинатдегидрогеназа (комплекс II) является ФАД-зависимым ферментом, который поставляет электроны непосредственно на убихинон, минуя НАД-зависимый комплекс I.

Таким образом, отсутствие изменений дыхательного контроля при добавлении сукцината (субстрат комплекса II) и снижение его при использовании малата с глутаматом (субстратов комплекса I) может свидетельствовать о том, что в митохондриях животных с МС нарушение митохондриальной функции возникает, главным образом, на уровне комплекса I электрон-транспортной цепи. Тот факт, что активность цитохром С-оксидазы (комплекса IV) оставалась неизменной также может подтверждать это допущение (рисунок).

Одной из причин развития митохондриальной дисфункции при МС и сахарном диабете может быть снижение в клетках содержания таурина вследствие накопления в них липидов, углеводов и полиолов, что вызывает нарушение осморегуляции и снижения буферной ёмкости митохондриального матрикса [14]. Известно, что недостаток указанной аминокислоты связан с дефицитом модифицированных тРНК, в результате чего изменяется экспрессия и трансляция белков внутри митохондрий, в том числе компонентов



Влияние таурина на активность цитохром С-оксидазы в изолированных митохондриях сердца крыс с МС, индуцированным ВФД (n = 6, M ± SEM).

дыхательной цепи, что приводит к снижению транспорта электронов, а также образованию супероксид аниона [13].

Следует отметить, что использование таурина способствовало повышению дыхательного контроля за счёт нормализации скорости АДФ-стимулированного дыхания митохондрий сердца в метаболическом состоянии 3 в присутствии малата с глутаматом в сравнении с животными, получавшими растворитель (табл. 2). Полученные данные могут свидетельствовать об улучшении процессов окислительного фосфорилирования на уровне комплекса I ЭТЦ под влиянием таурина и хорошо согласуются с гипотезой о его роли в сохранении буферной ёмкости митохондриального матрикса.

Известно, что при нарушении функции митохондрий значительно увеличивается генерация АФК, усиливающих митохондриальную дисфункцию, в результате чего образуется замкнутый порочный круг, который может быть разорван путём нормализации окислительного статуса митохондрий [30]. Установлено, что таурин выполняет функцию непрямого антиоксиданта, предотвращая метаболические нарушения, обусловленные синдромом инсулинорезистентности [11]. Важной ролью данной аминокислоты в ослаблении окислительного стресса является восстановление природного уровня антиоксидантов и защитных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы), а также подавление образования оксида азота и нитрозивного стресса путём супрессии индукцибельной формы NO-синтазы, хотя точный механизм этих эффектов до конца неизвестен [13, 31]. Ранее нами было показано, что применение таурина способствует нормализации про/антиоксидантного баланса у крыс с МС [32].

Таким образом, в результате проведенных экспериментов было установлено, что таурин тормозит метаболические проявления синдрома инсулинорезистентности и нормализует биоэнергетические процессы в сердечной мышце восстанавливая работу комплекса I электрон-транспортной цепи у крыс с МС.

Выводы

1. Применение таурина тормозит такие проявления метаболического синдрома, как интолерантность к углеводам, снижение чувствительности к инсулину, висцеральное ожирение у животных, содержащихся на высокофруктозной диете.

2. Таурин нормализует дыхательную функцию митохондрий сердца, восстанавливая работу комплекса I электрон-транспортной цепи у крыс с синдромом инсулинорезистентности.

3. Выявленные фармакологические свойства таурина свидетельствуют о перспективности его применения с целью профилактики и лечения сердечно-сосудистой патологии у больных с метаболическим синдромом.

References

- Hu F., Liu F. Mitochondrial stress: a bridge between mitochondrial dysfunction and metabolic diseases? *Cell signal.* 2011; 23(10): 1528-33.
- Tappy L., Le K. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol. rev.* 2010; 90: 23-46.
- Kim J., Wei Y., Sowers J. Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ. res.* 2008; 102: 401-14.
- Vial G., Dubouchaud H., Leverve X.M. Liver mitochondria and insulin resistance. *ABP.* 2010; 57(4): 389-92.
- Martins A.R., Nachbar R.T., Vinolo R., Festuccia W.T., Lambertucci R.H., Cury-Boaventura M.F. et al. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids in Health and Disease.* 2012; 11(30): 1-11.
- Ilkun O., Boudina S. Cardiac dysfunction and oxidative stress in the metabolic syndrome: an update on antioxidant therapies. *Curr. Pharm. Des.* 2013; 19(27): 4806-17.
- Giacco F., Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ res.* 2010; 107: 1058-70.
- Puerta C. Taurine and glucose metabolism: a review. *Nutr Hosp.* 2010; 25(6): 910-9.
- Ripps H., Shen W. Review: taurine: a «very essential» amino acid. *Molec. vision.* 2012; 18: 2673-86.
- Imae M., Asano T., Murakami S. Potential role of taurine in the prevention of diabetes and metabolic syndrome. *Amino Acids.* 2014; 46: 81-8.
- Ito T., Schaffer S.W., Azuma J. The potential usefulness of taurine on diabetes mellitus and its complications. *Amino Acids.* 2012; 42(5): 1529-39.
- Puerta D., Arrieta F.J., Balsa J.A., Botella-Carretero J.I., Zamarron I., Vazquez C. Taurine and glucose metabolism: a review. *C. Nutr. Hosp.* 2010; 25(6): 910-9.
- Hansen S.H., Andersen M.L., Cornett C, Gradinaru R, Grunnet N. A role for taurine in mitochondrial function. *J. biomed. sci.* 2010; 17: 23-30.
- Rikimaru M., Ohsawa Y., Wolf A.M., Nishimaki K., Ichimiya H., Kamimura N. et al Taurine ameliorates impaired the mitochondrial function and prevents stroke-like episodes in patients with MELAS. *Intern. Med.* 2012; 51: 3351-7.
- Levi B., Werman M. Long-term fructose consumption accelerates glycation and several age-related variables in male rats. *J. Nutrition.* 1998; 128(8): 1442-9.
- Загальні етичні принципи експериментів на тваринах. *Ендокринологія.* 2003; 8(1): 142-5.
- Chans B. *Cell turnover regulation.* М.; 1962. (in Russian)
- Straus W. Colorimetric determination of cytochrom c oxidase by formation of a quinonediiminium pigment from dimethyl-p-phenylenediamine. *Biochem. biophys. acta.* 1956; 19: 58-65.
- Bredford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing protein-dye binding. *Anal. biochem.* 1976; 72: 248-52.
- Lundholm L., Bryzgalova G., Gao H., Portwood N., Falt S., Berndt K.D. et al. The estrogen receptor α -selective

agonist propyl pyrazole triol improves glucose tolerance in ob/ob mice; potential molecular mechanisms. *Endocrinol.* 2008; 199: 275-86.

21. Glans S. *Medical-biological statistic transl. from engl.* Danilova J.A. M.: Praktika; 1998. (in Russian)

22. Marcinkiewicz J., Kontny E. Taurine and inflammatory diseases. *Amino Acids.* 2014; 46: 7-20.

23. Mayes P.A. Intermediary metabolism of fructose. *Amer. J. Clin. Nutr.* 1993.; 58(3): 754-65.

24. Gerrits P.M. Diabetes and fructose metabolism. *Amer. J. Clin. Nutr.* 1993; 58(1): 796-9.

25. Hirabara S.M., Gorjro R., Vinolo M.A., Rodrigues A.C., Nachbar R.T., Curi R. Molecular targets related to inflammation and insulin resistance and potential interventions. *J. biomed. & biotech.* 2012; 2012: 16 p.

26. Gorbenko N., Zvyagina T., Borikov O., Shalamay A., Ivanova O. Taurine protects against impairment of mitochondrial function and oxidative stress in the heart of rats with fructose-induced insulin resistance. In: the 5th Annual Meeting of the Diabetes & Cardiovascular Disease EASD Study Group: programme & abstracts. Paris; 2012. P. 106-107.

27. Dekker M.J., Su Q., Baker C., Rutledge A.C., Adeli K. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *Amer. J. Physiol Endocrinol Metab.* 2010; 299: 685-94.

28. Hernandez-Aguilera A., Rull A., Rodriguez-Gallego E., Riera-Borrull M., Luciano-Mateo F., Camps J. et al. Mitochondrial dysfunction: a basic mechanism in inflammation-related non-communicable diseases and therapeutic opportunities. *Mediators of Inflammation.* 2013; 2013: 13 p.

29. New Insights into insulin resistance in the diabetic heart Susan Gray and Jason K. Kim *Trends Endocrinol Metab.* 2011; October; 22(10): 394-403.

30. Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology Research and Practice.* 2014; 2014; 21 p.

31. Maranzana E, Barbero G., Falasca A., Lenaz G., Genova M.L. Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I. *Antioxidants & redox signaling.* 2013;19(13); 1469-80.

32. Le Lay S, Simard G., Martinez M.C., Andriantsitohaina R. *Oxidative stress and metabolic pathologies: from an adipocentric point of view.* 2014. Available at: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/908539>.