

О.В.Атаман, Ю.О.Атаман

Порівняльна характеристика порушень енергозабезпечення стінок артерій та вен у кролів з алоксановим діабетом і моноіодацетатною інтоксикацією

Показано порушення енергозабезпечення стінок грудної аорти і задньої порожнистої вени кролів через 2 тиж від початку відтворення алоксанового діабету та моноіодацетатної інтоксикації, що проявляється зниженням інтенсивності поглинання глюкози, споживання кисню, утворення молочної кислоти і ресинтезу аденозинтрифосфату (АТФ) у препаратах вивчених судин. При цьому істотно зменшується вміст АТФ у тканинах артерій і вен. Обговорюється можливе значення таких порушень у розвитку артеріосклерозу Менкеберга. Ключові слова: артерії, вени, алоксановий діабет, моноіодацетат, артеріосклероз Менкеберга.

ВСТУП

Незважаючи на те, що діабетичні макроангіопатії вивчають досить довго, механізми їх розвитку залишаються до кінця не з'ясовані. Про це, зокрема, свідчить велика кількість теорій і гіпотез щодо патогенезу склеротичних уражень судин у хворих на різні типи цукрового діабету.

Серед чинників, котрі можуть відігравати важливу роль в ушкодженні судинної стінки у хворих на діабет, великого значення надають розладам метаболізму тканин кровоносних судин. Ще в 60–80-ті роки минулого століття було встановлено, що розвиток експериментального діабету супроводжується пригніченням енергетичного обміну артеріальної стінки: інтенсивності споживання кисню, активності ферментів гліколітичного розщеплення глюкози, ресинтезу аденозинтрифосфату (АТФ) тощо [11, 17, 21, 22]. Проте відкритим залишається питання, чим зумовлені ці порушення – діабетичними змінами обміну речовин у

тканинах судин (дефіцит інсуліну) чи пов'язаними з діабетом відхиленнями гомеостазу (гіперглікемія, гіперліпопротеїнемія, ацидоз тощо). Крім того, неясно, який характер мають виявлені порушення: первинний (прояв власне діабету) чи вторинний, тобто є наслідком діабетичного ушкодження судин, що відбувається через інші причини (наприклад, оксидативний стрес, неферментне глікозилювання білків, активацію поліолового шляху деградації глюкози).

Один з підходів до з'ясування цього питання – порівняння обміну речовин у кровоносних судинах тварин з діабетом із змінами метаболізму судинної стінки, зумовленими патогенними чинниками з добре відомими механізмами дії. Таким агентом може бути, наприклад моноіодацетатна кислота (моноіодацетат) – метаболічна отрута, яка пригнічує енергетичний обмін, виступаючи специфічним інгібітором ключового ферменту гліколітичного розщеплення глюкози – гліцеральдегід-3-фосфат-

© О.В.Атаман, Ю.О.Атаман

дегідрогенази, що здійснює центральну гліколітичну оксидоредукцію. Водночас під впливом моноіодацетату пригнічується окиснення цілої низки субстратів (ізоцитрату, α -кетоглютарату, сукцинату, малату) у циклі Кребса, а також активність деяких ферментів пентозного циклу [5, 8].

Мета нашого дослідження – порівняти деякі основні показники енергетичного обміну судинної стінки у кролів з експериментальним алоксановим діабетом і у тварин з моноіодацетатною інтоксикацією для виявлення спільних і відмінних рис порушень метаболізму артерій і вен, що виникають при цьому.

МЕТОДИКА

Досліди виконано на 55 кролях-самцях віком 6 міс, масою 2,0–2,2 кг. Цукровий діабет відтворювали одноразовим внутрішньовенним введенням тваринам алоксану (“Sigma Aldrich”, США) з розрахунку 100 мг/кг. Препарат вводили в ізотонічному розчині хлориду натрію (загальний об’єм якого становив 5 мл) у крайову вену вуха кролів, що були позбавлені їжі протягом 18 год. Контрольним тваринам внутрішньовенно вводили таку саму кількість ізотонічного розчину NaCl.

Через 14 діб після ін’єкції тварин забивали. Концентрацію глюкози в крові контролювали перед початком експерименту та через 3, 7 і 14 діб. Вміст глюкози крові визначали за допомогою експрес-аналізатора “GLUCOCARD”.

Моноіодацетат вводили щодоби внутрішньовенно (у крайову вену вуха) з розрахунку 10 мг/кг протягом 14 діб. Відповідну кількість речовини додавали до фізіологічного розчину (10 мг/мл), рН доводили до 7,4 насиченим розчином NaHCO_3 . Через 24 год після останньої ін’єкції тварин забивали.

Евтаназію здійснювали, відтворюючи повітряну емболію. Одразу після забою тварин виділяли грудну аорту та задню

порожнисту вену. Судини поміщали в чашку Петрі з розчином Кребса, за допомогою гострого леза очищали їх від прилеглої жирової тканини і адвентиції, розрізали так, щоб утворювалися спіральні смужки. Одержані препарати поміщали в спеціальні скляні посудини, з’єднані з манометрами Варбурга. Натяг судинних смужок не створювали, що давало змогу вивчати мінімальний, так званий базальний рівень енергетичного обміну артерій і вен. Препарати інкубували в розчині Кребса протягом 3 год при концентрації глюкози 10 ммоль/л, газовим середовищем був кисень, температура становила 37,4 °С.

Споживання кисню ізольованими смужками судин здійснювали манометричним методом [6]. Інтенсивність поглинання глюкози розраховували за різницею її концентрації в розчині Кребса до і після тригодинної інкубації препаратів. Вміст глюкози визначали глюкооксидазним методом. Інтенсивність утворення молочної кислоти оцінювали за концентрацією лактату в середовищі одразу після закінчення інкубації смужок судин. Вміст лактату визначали гідрохіноновим методом [12]. Інтенсивність утворення АТФ препаратами артерій і вен розраховували за формулою: $J_{\text{АТФ}} = J_L + 4,9J_{\text{O}_2}$ [18], де $J_{\text{АТФ}}$ – інтенсивність утворення АТФ, J_L – інтенсивність утворення молочної кислоти, J_{O_2} – споживання кисню.

Вміст вільних аденінових нуклеотидів (АМФ, АДФ, АТФ) у тканинах артерій і вен визначали методом електрофорезу на папері [3, 20]. Розчинний у кислоті екстракт, отриманий із заморожених у рідкому азоті гомогенатів, розганяли протягом 3 год при напрузі 300 В і силі струму 30 мА. Після просушування паперові смужки вивчали в променях ультрахеміскопа, визначали локалізацію окремих фракцій, ідентифікуючи їх за отриманими при розгонці стандартного розчину плямах. Елюацію аденінових нуклеотидів проводили в 5 мл 0,1 N розчину хлористоводневої кислоти при

кімнатній температурі протягом 24 год. Елюати нуклеотидів і контрольної проби вивчали на спектрофотометрі СФ-26 (ЛОМО, Росія) при довжині хвиль 260 і 290 нм.

Увесь цифровий матеріал опрацьовано методами статистики з використанням критерію t Стьюдента та непараметричних статистичних методів (критерію Вілкоксона–Манна–Уїтні) [4, 7].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Одноразове введення кролям алоксану супроводжується значним підвищенням концентрації глюкози в крові, що відображає розвиток у тварин цукрового діабету. Так, базальна глікемія у них становила через 3 доби $21,3 \pm 0,73$; через 7 діб – $19,1 \pm 0,72$; через 14 діб – $17,8 \pm 0,76$ порівняно з $4,4$ ммоль/л $\pm 0,13$ ммоль/л на початку експерименту ($P < 0,001$). Максимальний рівень гіперглікемії відзначали через 3 доби

після введення алоксану, що характерно для цієї моделі цукрового діабету. У тварин, яким вводили моноіодацетат, вміст глюкози протягом усього часу експерименту залишався незмінним і становив $4,6 \pm 0,18$ на початку дослідів, $4,3 \pm 0,15$ через 3 доби, $4,5 \pm 0,15$ через 7 діб, $4,3$ ммоль/л $\pm 0,17$ ммоль/л через 14 діб ($P > 0,05$).

Результати проведених досліджень (таблиця) ще раз підтвердили, що рівень енергетичного обміну у венозній стінці кролів набагато вищий, ніж у тканинах аорти [1, 2]. Так, споживання кисню смужками венозних судин було приблизно в 5 разів більшим, якщо порівнювати з грудною аортою. Водночас продукування молочної кислоти в тканинах артерій відбувалося набагато (у 2,5 раза) швидше, ніж у венах. Як наслідок, інтенсивність ресинтезу АТФ у венозних судинах була більш як у 4 рази вищою порівняно з грудною аортою. Є думка, що такі відмінності в

Енергетичний обмін стінки грудної аорти та стінки задньої порожнистої вени кролів з алоксановим діабетом і моноіодацетатною інтоксикацією (M \pm m)

Показник	Алоксан		Моноіодацетат	
	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід
Стінка грудної аорти				
Поглинання глюкози, мкмоль \cdot г $^{-1}$ \cdot год $^{-1}$	$9,4 \pm 0,26$ (6)	$6,2 \pm 0,34^*$ (6)	$9,6 \pm 0,14$ (6)	$2,9 \pm 0,32^*$ (5)
Продукування молочної кислоти, мкмоль \cdot г $^{-1}$ \cdot год $^{-1}$	$8,4 \pm 0,35$	$6,0 \pm 0,33^*$	$8,5 \pm 0,27$	$4,4 \pm 0,39^*$
Споживання кисню, мкмоль \cdot г $^{-1}$ \cdot год $^{-1}$	$9,4 \pm 0,31$	$4,8 \pm 0,26^*$	$9,7 \pm 1,11$	$2,11 \pm 0,41^*$
Утворення аденозинтрифосфату, мкмоль \cdot г $^{-1}$ \cdot год $^{-1}$	$54,3 \pm 1,7$	$30,4 \pm 1,6^*$	$56,3 \pm 5,6$	$14,9 \pm 2,0^*$
Вміст аденозинтрифосфату, мкмоль \cdot г $^{-1}$	$0,35 \pm 0,031$ (6)	$0,2 \pm 0,024^*$ (6)	$0,35 \pm 0,035$ (10)	$0,2 \pm 0,035^*$ (10)
Стінка задньої порожнистої вени				
Поглинання глюкози, мкмоль \cdot г $^{-1}$ \cdot год $^{-1}$	$11,2 \pm 0,37$ (6)	$4,1 \pm 0,2^*$ (6)	$10,6 \pm 0,32$ (6)	$5,3 \pm 0,35^*$ (5)
Продукування молочної кислоти, мкмоль \cdot г $^{-1}$ \cdot год $^{-1}$	$3,4 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,1^*$	$3,0 \pm 0,33$	$1,8 \pm 0,26^*$
Споживання кисню, мкмоль \cdot г $^{-1}$ \cdot год $^{-1}$	$44,6 \pm 0,88$	$15,7 \pm 0,54^*$	$52,9 \pm 3,2$	$25,0 \pm 2,9^*$
Утворення аденозинтрифосфату, мкмоль \cdot г $^{-1}$ \cdot год $^{-1}$	$222 \pm 4,5$	$79 \pm 2,7^*$	$264 \pm 15,8$	$125 \pm 14,4^*$
Вміст аденозинтрифосфату, мкмоль \cdot г $^{-1}$	$0,55 \pm 0,037$ (6)	$0,25 \pm 0,021^*$ (6)	$0,5 \pm 0,023$ (10)	$0,17 \pm 0,036^*$ (10)

Примітка. У дужках – кількість тварин, *P < 0,05.

енергозабезпеченні артерій і вен можуть пояснювати різну стійкість цих типів судин до розвитку склеротичних уражень [2].

Відтворення алоксанового діабету супроводжується значним пригніченням усіх вивчених показників енергетичного обміну як артеріальних, так і венозних судин (рисунок). Слід зазначити, що пригнічення в тканинах задньої порожнистої вени було значно більшим порівняно з грудною аортою.

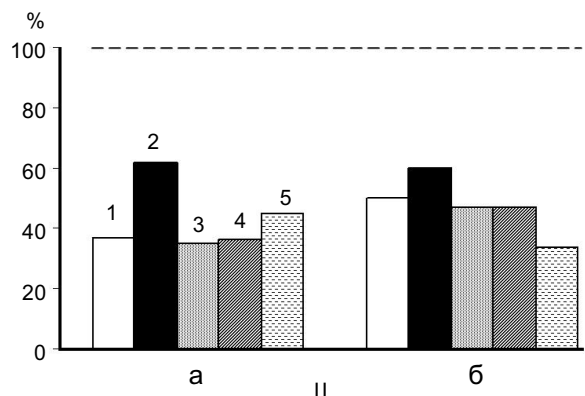
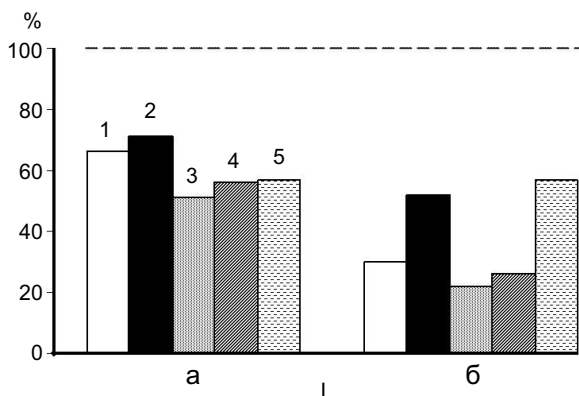
Інтوكсикація моноіодацетатом, так само як і алоксановий діабет, порушує енергозабезпечення кровоносних судин. Відмінності, однак, полягають у тому, що в грудній аорті за умов моноіодацетатної інтоксикації ці порушення були більш вираженими, ніж за умов алоксанового діабету, тоді як у задній порожнистій вені – навпаки.

Доведено [1, 2], що пригнічення енергозабезпечення кровоносних судин за допомогою моноіодацетату закономірно призводить до розвитку уражень артеріальної стінки, що мають ознаки артеріосклерозу Менкеберга: некроз, кальциноз і склерозування середньої оболонки (медії) аорти кролів. Крім того, введення кролям цієї отрути зменшує високу стійкість венозних судин до розвитку гіпер-D-вітамінозних уражень.

У дослідженнях показано, що розвитку виражених проявів артеріосклерозу Менке-

берга передують зменшення валових показників енергозабезпечення судинної стінки (споживання кисню, ресинтезу АТФ тощо). Це стосується не тільки згадуваної моноіодацетатної моделі, а й дії токсичних доз адреналіну та вітаміну D. Водночас при моделюванні холестеролового атеросклерозу такого зв'язку не існує, більше того, на ранніх стадіях його розвитку артеріальна стінка реагує не зменшенням, а навіть збільшенням основних показників енергопостачання.

З огляду на це, є підстави вважати, що виявлене нами пригнічення енергетичного обміну в судинах кролів з алоксановим діабетом може бути одним із механізмів розвитку макроангіопатій, котрі виявляють себе саме дистрофічно-склеротичними ураженнями медії. Про те, що менкебергівський тип уражень артерій у хворих на цукровий діабет (особливо 2-го типу) розвивається так само часто (а може й частіше!), як і “класичний” атеросклероз, свідчить велика кількість праць [10, 13, 14, 15]. А тому пошук механізмів, котрі лежать в основі цього виду макроангіопатій, нині є вкрай актуальним. Одним з них може бути індукована діабетичною гіперглікемією гіперпродукція супероксидних аніон-радикалів [19]. Останні чинять сильну інгібіторну дію на гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу – ключовий фермент гліколізу.



Зміни показників енергетичного обміну артеріальної (I) і венозної (II) стінки у кролів з алоксановим діабетом (а) і моноіодацетатною інтоксикацією (б). Пунктирна лінія – контроль (100 %): 1 – поглинання глюкози, 2 – продукування молочної кислоти, 3 – споживання кисню, 4 – утворення аденозинтрифосфату, 5 – вміст аденозинтрифосфату

Якщо взяти до уваги, що моноіодацетат є специфічним інгібітором цього ферменту [5, 8], то можна дійти висновку, що в основі порушень енергозабезпечення судинної стінки у тварин з алоксановим діабетом і моноіодацетатною інтоксикацією лежать схожі механізми, пов'язані з пригніченням гліколітичного розщеплення глюкози та подальшого її використання в реакціях клітинного дихання.

Зменшення інтенсивності гліколізу в судинах тварин з діабетом, крім безпосереднього впливу на їх енергопостачання, може мати й інші наслідки, які зумовлюють ушкодження клітин судинної стінки. Серед них – активація поліолового та гексозамінового шляхів деградації глюкози, що і визначають значну частину ефектів глюкотоксичності [9, 16]. Вивчення ролі цих шляхів у розвитку артерioskлерозу Менкеберга взагалі та при цукровому діабеті зокрема може пролити світло на патогенез зазначеного типу уражень.

ВИСНОВКИ

1. Алоксановий діабет і моноіодацетатна інтоксикація у кролів супроводжуються істотним пригніченням енергозабезпечення як артеріальної, так і венозної стінки.

2. Однакова спрямованість і вираженість змін енергетичного обміну судин при обох моделях може бути частково зумовлена схожими механізмами ушкоджувальної дії.

3. Пригнічення енергозабезпечення артеріальної стінки слід розглядати як один з можливих механізмів розвитку діабетичних макроангіопатій, що виявляють себе артерioskлерозом Менкеберга.

А.В.Атаман, Ю.А.Атаман

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НАРУШЕНИЙ ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕНИЯ СТЕНОК АРТЕРИЙ И ВЕН У КРОЛИКОВ С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ И МОНОИОДАЦЕТАТНОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ

В опытах на кроликах показаны нарушения энерго-

обеспечения стенок грудной аорты и задней полой вены через 2 нед от начала воспроизведения аллоксанового диабета и моноиодацетатной интоксикации, что проявляется снижением интенсивности поглощения глюкозы, потребления кислорода, образования молочной кислоты и ресинтеза аденозинтрифосфата (АТФ) в препаратах изученных сосудов. При этом существенно уменьшается содержание АТФ в тканях артерий и вен. Обсуждается возможное значение этих нарушений в развитии артериосклероза Менкеберга.

Ключевые слова: артерии, вены, аллоксановый диабет, моноиодацетат, артериосклероз Менкеберга.

A.V.Ataman, Y.A.Ataman

COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF ENERGY SUPPLY DISTURBANCES IN ARTERIAL AND VENOUS WALLS OF RABBITS WITH ALLOXAN DIABETES AND MONOIODACETATE INTOXICATION

We showed here that energy metabolism in thoracic rabbit aorta and posterior vena cava is disturbed two weeks following the induction of alloxan-induced diabetes and monoiodacetate intoxication. In the vessels studied, the alterations are manifested in the decrease in the intensity of glucose uptake, oxygen consumption, lactic acid production, and ATP resynthesis. Simultaneously, the ATP content is significantly reduced. The possible significance of these disorders in the development of Monckeberg's arteriosclerosis is discussed. Key words: arteries, veins, alloxan diabetes, monoiodacetate, Monckeberg's arteriosclerosis.

Sumy University of Ministry of Education and Science, Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Атаман О.В. Венозна стінка: загальнотеоретичні й експериментальні аспекти.– Суми: Ангіо, 2001. – 248 с.
2. Быць Ю.В., Пишак В.П., Атаман А.В. Сравнительно-патолофизиологические аспекты энергообеспечения сосудистой стенки. – К. – Черновцы: Прут, 1999. – 330 с.
3. Воскобойников Г.В. Электрофоретическое разделение и расчет содержания кислоторастворимых нуклеотидов из тканей животных // Вопр. мед. химии. – 1970. – 16, №3. – С. 323–326.
4. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. – Л.: Медицина, 1973. – 141 с.
5. Лабори А. Регуляция обменных процессов. – М.: Медицина, 1970. – 438 с.
6. Тринус Ф.П. Методика одновременной регистрации сокращения и дыхания изолированной мускулатуры сосудов // Фармакология и токсикология. – 1963. – 26, №3. – С. 375–377.

7. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. – М.: Медицина, 1975. – 295 с.
8. Уэбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизм. – М.: Мир, 1966. – 654 с.
9. Buse M.G. Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status // Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metabol. – 2006. – **290**. – P. E1–E8.
10. Chen N.X., Moe S.M. Arterial calcification in diabetes // Curr. Diab. Rep. – 2003. – **3**. – P. 28–32.
11. Dahlqvist H.H., Arnqvist H.J., Norrby K. Influence of diabetes on oxidation of exogenous substrates in rat aorta // Diabete Metabol. – 1981. – **7**. – P. 275–281.
12. Dische Z., Laszlo D. Über eine neue kolorimetrische Bestimmungsmethode der Milchsäure im Blute // Bioch. Zeitschrift. – 1927. – **187**. – S. 344–362.
13. Edmonds M.E. Medial arterial calcification and diabetes mellitus // Z. Kardiol. – 2000. – **89**. – P. 101–104.
14. Everhart J.E., Pettitt D.J., Knowler W.C., Rose F.A., Bennett P.H. Medial arterial calcification and its association with mortality and complications of diabetes // Diabetologia. – 1988. – **31**. – P. 16–23.
15. Fuchs U., Caffier P., Schulz H.G., Wieniecki P. Arterial calcification in diabetics // Virch. Arch. – 1985. – **407**. – P. 431–439.
16. Gleissner C.A., Galkina E., Nadler J.L., Ley K. Mechanisms by which diabetes increases cardiovascular disease // Drug Discov. Today Dis. Mech. – 2007. – **4**. – P. 131–140.
17. Morrison A.D., Clements R.S., Winegrad A.I. Effects of elevated glucose concentrations on the metabolism of the aortic wall // J. Clin. Invest. – 1972. – **51**. – P. 3114–3123.
18. Peterson J.W., Paul R.J. Aerobic glycolysis in vascular smooth muscle: relation to isometric tension // Biochim. and Biophys. Acta. – 1974. – **357**. – P. 167–176.
19. Rolo A.P., Palmeira C.M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2006. – **212**. – P. 167–178.
20. Sato T.R., Thomson J.F., Dantorth W.F. Electrochromatographic separation of inorganic phosphate, adenosine monophosphate, adenosine diphosphate, adenosine triphosphate // Anal. Biochem. – 1963. – **5**. – P. 542–547.
21. Winegrad A.I., Yalcin S., Mulcahy P.D. Alterations in aortic metabolism in diabetes // On the nature and treatment of diabetes. – Amsterdam etc.: Excerpta medica foundation, 1965. – P. 452–462.
22. Yalcin S., Winegrad A.I. Defect in glucose metabolism in aortic tissue from alloxan diabetic rabbits // Amer. J. Physiol. – 1963. – **205**. – P. 1253–1259.

Сумск. ун-т М-ва освіти і науки України
E-mail: ataman_av@mail.ru

Матеріал надійшов до
редакції 21.09.2010