

О.Д. Присяжна, А.В. Коцюрuba, С.О. Таланов, В.Ф. Сагач

Нормалізувальний вплив інтервального гіпоксичного тренування на функцію ендотелію при експериментальному цукровому діабеті

Изучали изменения функции эндотелия при экспериментальном сахарном диабете под воздействием интервальных гипоксических тренировок (ИГТ). Показано, что после них происходит снижение выраженности гипергликемии и нормализация эндотелийзависимых сосудистых реакций. Активность конститутивной NO-синтазы в сердце после ИГТ значительно возрастает, а активность индуцибельной NO-синтазы резко снижается. В аорте также отмечается значительное снижение последнего показателя. Увеличивается содержание нитрит-аниона как в сердце, так и в аорте. ИГТ приводит к уменьшению содержания таких маркеров окислительного стресса, как перекись водорода и диеновые конъюгаты. Таким образом, действие ИГТ проявляется в уменьшении гипергликемии, снижении выраженности окислительного стресса, частичной нормализации синтеза оксида азота и восстановлении функции эндотелия у крыс с экспериментальным сахарным диабетом.

ВСТУП

Нині збільшується інтерес дослідників до протективного впливу дозованої гіпоксії на перебіг різних патологічних станів. Так, показано, що інтервальні гіпоксичні тренування (ІГТ) зменшують ушкоджувальну дію ішемії–реперфузії на кардіодинаміку як у дорослих, так і у старих тварин, а також біохімічні порушення при різних інших патологічних процесах [2, 3, 4]. Щоденні протягом 21 доби гіпоксичні тренування як щурів з експериментальним стрептозоточиніндукованим цукровим діабетом, так і пацієнтів з цукровим діабетом І типу призводять до стимуляції β -клітин острівців Лангенгарса та підвищення вмісту інсуліну в крові, а також до інших позитивних терапевтичних ефектів [1]. Проте вплив ІГТ на ендотеліальну дисфункцію при експериментальному цукровому діабеті залишається невивченим, і саме це стало метою нашого дослідження.

МЕТОДИКА

Дослідження були проведені на моделі стрептозоточиніндукованого цукрового діабету. Для цього щурам-самцям лінії Вістар–Кіото віком 4 міс і масою 200–250 г було введено внутрішньоочеревинно стрептозоточин (“Sigma”, США) з розрахунку 50 мг/кг. У дослід брали тварин через 8–10 тиж після введення препарату. Контроль глюкози в крові здійснювали за допомогою глюкометра “Медісенс” (“Abbott”, США).

Вивчення впливу гіпоксії на функцію ендотелію. Щури з експериментальним цукровим діабетом були піддані впливу гіпоксичної гіпоксії. Для цього тварин розміщували в камері, заповненій газовою сумішшю: 12 % кисню і 88 % азоту. ІГТ проводили за схемою: 15 хв – гіпоксія, 15 хв – нормоксія, 5 разів на добу протягом тижня. Наступної доби після закінчення такого курсу тварин брали в експеримент. Судинні реакції досліджували на ізольованих препаратах грудного відділу аорти.

© О.Д. Присяжна, А.В. Коцюрuba, С.О. Таланов, В.Ф. Сагач

Аорту нарізали на сегменти шириною 1,5–2 мм і масою 2–2,5 мг з урахуванням циркулярної орієнтації гладеньком'язового шару. Кільцевий препарат для дослідження поміщали в проточну термостатовану (36–36,5°C) камеру об'ємом 1 см³, в якій препарат піддавали пасивному розтягуванню силою 5–10 мН і витримували протягом 30–60 хв у модифікованому розчині Кребса наступного складу (ммоль/л): NaCl – 133,0; KCl – 4,7; NaHCO₃ – 16,3; NaH₂PO₄ – 1,38; CaCl₂ – 2,5; MgCl₂ – 1,05; глюкоза – 7,8 (рН 7,4).

Активації гладеньких м'язів досягали додаванням до перфузуючого розчину 10⁻⁵ моль/л норадреналіну ("Sigma", США). Скоротливу активність аорти реєстрували в режимі, наближеному до ізометричного, за допомогою механоелектричного перетворювача 6MX1C. Для вивчення ендотеліозалежних реакцій судинного препарату реєстрували зміни тонічного напруження гладеньких м'язів при додаванні агоніста мускаринових рецепторів ацетилхоліну гідрохлориду 10⁻⁶ моль/л ("Fluka", Швеція). Рівень скорочення гладеньких м'язів на дію норадреналіну приймали за 100 %. Амплітуду зміни тонічного напруження судинного препарату при додаванні до розчину ацетилхоліну розраховували у відсотках від рівня їх стійкого скорочення ("плато").

У гомогенатах серця та аорти дослідних і контрольних щурів визначали активність NO-синтаз (NOS), вміст стабільного метаболіту NO – нітрит-аніона (NO₂⁻). Розраховували частку активності конститутивних ізоформ NOS (сNOS). Крім того, визначали вміст перекису водню і дієнових кон'югатів.

Визначення активності NO-синтаз. Для визначення активності NOS (кальційзалежної і кальційнезалежної) використовували комбінацію класичного методу та його сучасної модифікації для вимірювання спектрофотометрії вмісту одного з продуктів реакції – нітрит-аніона. З цією метою в 10 разів збільшували об'єм субстратної суміші, а визначення активності ферменту

проводили з мінімальною кількістю кофакторів для наближення визначуваної активності NOS до базального рівня в досліджуваних тканинах. L-аргінін додавали в надлишку, враховуючи його можливу утилізацію в аргіназній реакції.

При визначенні активності сумарної NO-синтази (конститутивної та індукційної – сNOS і іNOS відповідно) аліквоти грубих гомогенатів тканин (при визначенні сумарної активності NOS фракціонування гомогенатів не проводили), в яких містилося 500–1000 мкг білка, інкубували в 1 мл субстратної суміші наступного складу (ммоль/мл): KH₂PO₄ – 50, MgCl₂ – 1, CaCl₂ – 2, НАДФН – 1, L-аргінін – 2 (рН 7,0) протягом 60 хв и 37°C. Реакцію зупиняли, додаючи 0,3 мл 2 N HClO₄.

Контролем були проби, в яких містилася повна субстратна суміш і білок, заздалегідь денатурований за допомогою 2 N HClO₄. Суміш центрифугували при 3500 хв⁻¹ протягом 10 хв, а в надосадовій суміші визначали вміст NO₂⁻ методом спектрофотометрії за кольоровою реакцією з реактивом Гріса. У разі визначення активності іNOS використовували аналогічну методику за винятком наступних відмінностей: для визначення активності кальційнезалежної NOS в інкубаційну суміш замість CaCl₂ додавали 2 мкмоль EDTA.

Активність сNOS вираховували, віднімаючи від сумарної активності NOS активність іNOS.

Активність ферментів виражали в пікомолях NO₂⁻, що знов утворився, за 1 хв з розрахунку на 1 мг загального білка в пробі.

Визначення вмісту NO₂⁻. Вміст NO₂⁻ визначали в безбілкових надосадових аліквотах після дослідження активності NOS або в безбілкових розчинах гомогенатів тканин клітин (вміст білка 20–40 мг/мл) при використанні колориметричної реакції за допомогою реактиву Гріса методом Гріна [8].

Визначення вмісту білка. Вміст загального білка в пробах визначали за допомо-

гою стандартного методу Бредфорда, використовуючи барвник Сumassi G-250.

Результати обробляли методом варіаційної статистики, використовуючи програмне забезпечення «Origin pro 7.0» корпорації “Microcal Software”(США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вміст глюкози в крові щурів з діабетом до ІГТ становив $15,3 \text{ ммоль/л} \pm 2,1 \text{ ммоль/л}$ (контроль – $6,4 \text{ ммоль/л} \pm 0,6 \text{ ммоль/л}$), після ІГТ він знижувався до $7,1 \text{ ммоль/л} \pm 0,4 \text{ ммоль/л}$. Це може бути пов'язано з нормалізацією утилізації глюкози, ймовірно, внаслідок збільшення продукції інсуліну в клітинами острівців Лангерганса, оскільки відомо, що під впливом ІГТ відбувається активація біосинтезу інсуліну та новоутворення β -клітин, а також спостерігається гальмування їх деструкції [1].

Більше того, є дані щодо значного посилення секреції ендогенного інсуліну у пацієнтів з цукровим діабетом I типу під впливом ІГТ [1]. В іншому дослідженні у щурів, адаптованих до високогірної гіпоксії, спостерігалось поліпшення гормональної функції інсулярного апарату та інсулін-зв'язувальної здатності еритроцитів [6].

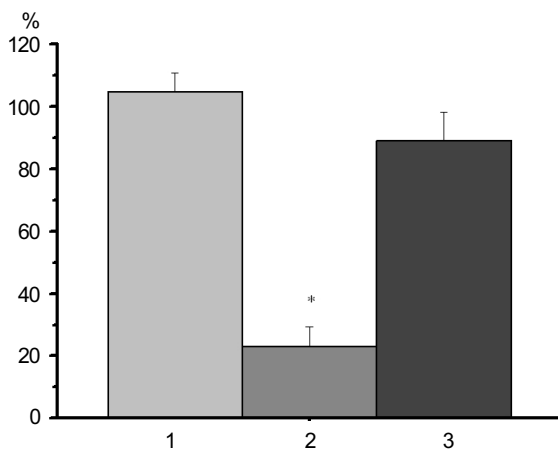


Рис. 1. Вплив інтервального гіпоксичного тренування на ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів аорти при експериментальному цукровому діабеті: 1 – контроль, 2 – діабет, 3 – діабет і гіпоксичне тренування * $P < 0,05$

Як було показано нами раніше [5], при експериментальному цукровому діабеті порушуються, перш за все, ендотелійзалежні судинні реакції (розслаблення судинних препаратів аорти під дією ацетилхоліну у контрольних тварин знижується з $104,9 \pm 5,9$ до $23,1 \% \pm 6,2 \%$). У тварин з діабетом після ІГТ рівень розслаблення препаратів аорти сягав $89,1 \% \pm 9,2 \%$, тобто був вищим порівняно зі значенням у тварин, які не підлягали дії ІГТ і не відрізнявся від контролю (рис. 1). Таким чином, ІГТ відновлює порушене при експериментальному цукровому діабеті ендотелійзалежне розслаблення судинних гладеньких м'язів.

Аналіз зміни активності ізоформ NOS у серці при експериментальному цукровому діабеті вказує на зниження активності cNOS і, відповідно, сумарної NOS (рис. 2). При цьому частка активності cNOS зменшується з 67,3 до 19,3 %. Під впливом ІГТ цей показник збільшується, а активність iNOS різко знижується. В результаті сумарна активність NOS також знижується, проте частка активності cNOS підвищується до 88,43 %. У аорті активність iNOS після ІГТ також зменшується з $130,21 \pm 30,12$ до $(57,87 \pm 19,3) \text{ пмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1} \text{ білка}$, а активність cNOS і сумарної NOS досто-

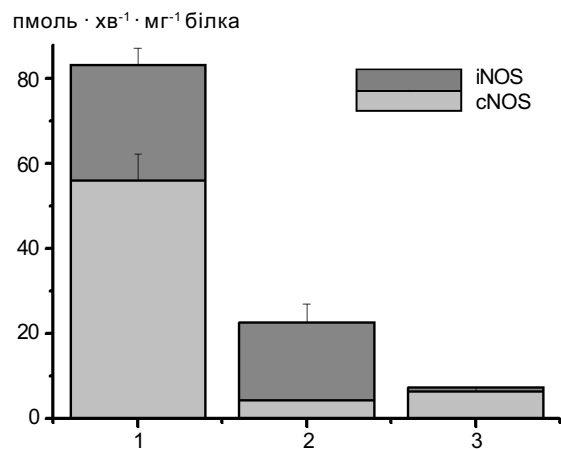


Рис. 2. Зміна активності ізоформ NO-синтази у тканині серця під впливом інтервальних гіпоксичних тренувань за умов експериментального цукрового діабету: 1 – контроль, 2 – діабет, 3 – діабет і гіпоксичне тренування

вірно не змінюється. При цьому відносна активність cNOS змінюється під впливом ІГТ з 42,4 до 61,3 %, у контрольній групі 80,41 %.

Відповідно до змін активності NOS змінювався і вміст метаболіта NO – нітрит-аніона. Так, в серці щурів після ІГТ вміст NO₂⁻ збільшився з 43,28 ± 10,65 до 68,55 пмоль/мг білка ± 6,77 пмоль/мг білка (у контрольній групі 454,44 пмоль/мг білка ± 41,55 пмоль/мг білка), а в аорті з 253,88 ± 40,09 до 836,65 пмоль/мг білка ± 211,73 пмоль/мг білка відповідно (у контрольній групі 341,43 пмоль/мг білка ± 53,61 пмоль/мг білка).

Отримані результати вказують на порушення синтезу оксиду азоту, як прояв дисфункції ендотелію при діабеті, а також на можливість часткового відновлення активності NOS під впливом ІГТ.

Відомо, що одним з найважливіших механізмів глюкозотоксичності, на які може впливати ІГТ, є оксидативний стрес [7, 9]. Ми розглянули такі маркери останнього, як вміст перекису водню та дієнових кон'югатів.

У тканині аорти вміст перекису водню при діабеті підвищувався з 57,96 ± 6,16 до 88,72 пмоль/мг білка ± 1,0 пмоль/мг білка, а під впливом ІГТ знижувався до 66,37 пмоль/мг білка ± 8,1 пмоль/мг білка. У тканині серця ІГТ також сприяло зниженню вмісту H₂O₂ з 3,68 ± 0,55 до 0,92 пмоль/мг білка ± 0,18 пмоль/мг білка. Аналогічно змінювався і вміст дієнових кон'югатів. У тканині серця під впливом ІГТ цей показник знижувався з 32,07 ± 1,71 до 2,57 нг/мг білка ± 0,6 нг/мг білка (у контрольній групі 3,26 нг/мг білка ± 0,40 нг/мг білка).

Таким чином, нормалізувальна дія ІГТ на функцію ендотелію при експериментальному діабеті може бути опосередкована зменшенням проявів оксидативного стресу.

ВИСНОВКИ

1. При експериментальному цукровому діабеті порушується ендотелійзалежна

розслаблення судинних гладеньких м'язів у результаті порушення функціонування системи оксиду азоту. Одним з можливих механізмів таких порушень є окиснювальний стрес.

2. Під впливом ІГТ відбувається зниження глікемії у тварин з експериментальним цукровим діабетом, що може бути пов'язане з посиленням синтезу ендогенного інсуліну.

3. Після проведення ІГТ спостерігається зниження вмісту маркерів окиснювального стресу і часткова нормалізація синтезу оксиду азоту в тканинах серця та судин. Внаслідок таких біохімічних змін відновлюються ендотелійзалежні реакції судинних гладеньких м'язів.

**O.D. Prysyzhna, A.V. Kotsyuruba,
C.A. Talanov, V.F. Sagach**

NORMALIZING INFLUENCE OF INTERVAL HYPOXIC TRAINING ON THE FUNCTION OF ENDOTHELIUM AT EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

The purpose of the study was to investigate changes of endothelial function at experimental diabetes mellitus under the action of interval hypoxic trainings (IHT). A decrease of hyperglycemia and normalization of endothelium-dependent vascular reactions are shown after IHT. Activity of constitutive NOS in the heart after IHT increases considerably while activity of inducible NOS decreases sharply. Considerable diminution of iNOS activity after IHT also registered in aorta. Nitrite-anion content (NO₂⁻) increased both in the heart and in aorta. IHT results in diminishing level of such markers of oxidizing stress as a hydrogen peroxide and dien conjugates. Thus, the action of IHT consist in diminishing of hyperglycemia, decline of expressed of oxidizing stress, partial normalization of synthesis of nitric oxide and renewal of endothelial function in rats with experimental diabetes.

*O.O. Bogomolets Institute of Physiology, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Колесник Ю.М., Жулинский В.А., Каджарян В.Г., Сиволап В.Д., Абрамов А.В., Куринная И.В., Середенко М.М. Способ лечения сахарного диабета I типа // Патент Украины № 23670 от 25.11.1996 г.
2. Колчинская А.З., Цыганова Т.Н., Остапенко Л.А.

- Нормобарическая интервальная гипоксическая тренировка в медицине и спорте. – М.: Медицина, 2003. – 408 с.
3. Лямина Н.П., Сенчихин В.Н., Покидышев Д.А., Манухина Е.Б. Нарушение продукции оксида азота у мужчин молодого возраста с артериальной гипертензией и немедикаментозный метод ее коррекции // Кардиология. – 2001. – №9. – С. 17–21.
 4. Меерсон Ф.З. Адаптация, стресс и профилактика. – М.: Наука, 1981. – 237 с.
 5. Сагач В.Ф., Ткаченко М.М., Присяжная О.Д. і др. Зміни вазодилататорних реакцій судинних гладеньких м'язів та системи оксиду азоту за умов експериментального цукрового діабету // Фізіол. журн. – 2003. – 49, № 4. – С. 24–32.
 6. Тихонова Н.Е., Кучук Э.М., Шаляпина В.Г. Гормональная функция инсулярного аппарата и инсулин-связующая способность эритроцитов при адаптации крыс к высокогорью // Физиол. журн. СССР им. И.М. Сеченова. – 1987. – 273, № 4. – С. 469–474.
 7. Baynes J.W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes // Diabetes. – 1991. – 40, № 4. – P. 405–412.
 8. Green L.C., David A.W., Glogovski J. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. – 1982. – 126, №1. – P. 131–138.
 9. Giugliano D., Ceriello A., Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications // Diabetes Care. – 1996. – 19, № 3. – P. 257–267.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,
Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 03.01.2007*