

О.Д. Присяжна, В.Ф. Сагач

Роль мітохондріальних білків-роз'єднувачів у порушенні ендотелійзалежних скорочувальних реакцій серця та судин за умов експериментального цукрового діабету

На моделі стрептозотоциніндуцированного сахарного діабета у крыс було досліджено вплив блокатора мітохондріальних білків-розобителів окислення – фосфорилування генипину на ендотелійзалежні скоротельні реакції судин, скоротельну функцію і кислородну цінність роботи міокарда. Показано, що внутрішньобрюшинна ін'єкція генипину приводить до частичного відновлення порушених при сахарному діабеті судинних реакцій, а також до зменшення кислородної цінності роботи міокарда. Так, після введення цього препарату в дозу 10 мг/кг спостерігається частичне відновлення ендотелійзалежної дилатації аорти і коронарних судин, ріст скоротельних відповідей судинних гладких м'язів на розтягнення, зменшення жорсткості ізольованих смуг ворітної вени, поліпшення скоротельних властивостей і зменшення жорсткості міокарда. Такі результати вказують на можливу роль мітохондріальних білків-розобителів окислення – фосфорилування в розвитку порушених скоротельних реакцій серця і судин, спостережених при експериментальному сахарному діабеті.

ВСТУП

Роз'єднувальні протеїни (від англ. UCP-uncoupling proteins) – це білки, які розташовані на внутрішній мембрані мітохондрій. Вони належать до групи мітохондріальних транспортних білків.

Роз'єднувальні протеїни діють як переносники протонів, які активуються метаболітами та створюють шунт між комплексами дихального ланцюга та АТФ-синтазою [9, 13]. Збільшення потоку протонів через внутрішню мембрану мітохондрій може призводити до зменшення продукції супероксиду [9]. Суї та співавт. [9] показали, що при збільшенні вмісту глюкози збільшуються вміст активних форм кисню в мітохондріях ендотеліоцитів, частота клітинної смерті та мембранний потенціал мітохондрій. При цьому компенсаторно підвищується

експресія роз'єднувальних протеїнів і мітохондральної супероксиддисмутази, чого не спостерігається при нормальному вмісті глюкози. Експресія роз'єднувальних протеїнів підвищується як у пацієнтів з цукровим діабетом (I та II типу), так і у мишей зі стрептозотоциніндукованим цукровим діабетом [20]. Дерге також показав, що за умов стрептозотоциніндукованого цукрового діабету втричі збільшується експресія роз'єднувальних протеїнів-3 [10].

Таким чином, за умов цукрового діабету під дією гіперглікемії посилюється синтез активних форм кисню в мітохондріях. Для компенсації розвитку оксидативного стресу збільшується експресія роз'єднувальних протеїнів та супероксиддисмутази. Це призводить до зменшення мембранного потенціалу мітохондрій і пригнічення синтезу АТФ. При тривалій та/або надмірній

© О.Д. Присяжна, В.Ф. Сагач

гіперглікемії такі ефекти можуть спричинити негативні наслідки. Так, зменшення синтезу АТФ сприяє збільшенню кисневої вартості роботи та порушенню розслаблення м'язових клітин. Відомо, що у лінійних мишей з низьким рівнем експресії роз'єднувальних протеїнів киснева вартість роботи скелетних м'язів збільшується на 98 %, а у мишей з високим її рівнем на 246 % порівняно з контрольними [16].

За умов стрептозотоциніндукованого цукрового діабету (загальноживана модель цукрового діабету I типу) спостерігається комплекс порушень серцево-судинної реактивності, що можуть бути спричинені хронічною гіперглікемією [3–5].

У дослідженні Zhang та співавт. [21] було показано, що геніпін – невелика молекула рослинного походження, швидко пригнічує активність роз'єднувальних протеїнів-2. У клітинах панкреатичних острівців геніпін збільшує мембранний потенціал мітохондрій і підвищує вміст АТФ. Показано, що така дія зумовлена саме впливом на ці протеїни. Мета нашої роботи – вивчення ролі мітохондріальних білків-роз'єднувачів у розвитку таких порушень.

МЕТОДИКА

Експерименти проведено на щурах-самцях лінії Вістар. До I групи ввійшли контрольні щури віком 5–6 міс, до II – щури з експериментальним цукровим діабетом. Для моделювання цукрового діабету щурам віком 3–4 міс вводили внутрішньоочередово стрептозотин з розрахунку 50 мг/кг однократно. Для дослідів використовували тварин через 10–12 тиж після ін'єкції. Контроль вмісту глюкози в крові здійснювали за допомогою глюкометра “Медісенс” (“Abbott”, США). До III групи ввійшли – щури з експериментальним цукровим діабетом, яким за 1 год до початку експерименту вводили геніпін (10 мг/кг) як блокатор роз'єднувальних протеїнів.

Скорочувальну активність судинних

смужок реєстрували в режимі, наближеному до ізометричного, за допомогою механоелектричного перетворювача 6MX1C. Ендотелійзалежне розслаблення судинних гладеньких м'язів досліджували на кільцевих препаратах грудного відділу аорти. Активації гладеньких м'язів досягали додаванням до буферного розчину норадреналіну (10^{-5} моль/л). Для дослідження ендотелійзалежного розслаблення судинного препарату реєстрували зміни тонічного напруження гладеньких м'язів на введення ацетилхоліну гідрохлориду (10^{-6} моль/л). Амплітуду зміни тонічного напруження судинного препарату при додаванні до розчину ацетилхоліну розраховували у відсотках від рівня їхнього стійкого скорочення на адреналін (“плато”).

Дослідження скорочувальних реакцій і жорсткості судинних гладеньких м'язів під впливом дозованого розтягування проводили на ізольованих смужках ворітної вени. Смужки дозовано розтягували до 8–14 мН і реєстрували зміну амплітуди фазних скорочень для отримання динаміки залежності довжина–сила скорочень гладеньких м'язів судин. За допомогою мікроскопа МБС-10 та окулярного гвинтового мікрометра МОВ-1-15 вимірювали довжину судинного препарату ворітної вени. Розраховували відносний приріст сили скорочень і жорсткість смужки, що являє собою відношення приросту сили скорочень до зміни довжини судинного препарату у перерахунку на масу смужки [1, 8].

Дослідження скорочувальної функції серця проводили на ізольованих серцях щурів за методом Лангендорфа [14]. Перфузію коронарних судин здійснювали ретроградно через аорту з постійним тиском 75–80 мм рт. ст. модифікованим розчином Кребса – Хензелята. У порожнину лівого шлуночка вставляли поліетиленовий балончик, з'єднаний з тензодатчиком. Реєстрували систолічний тиск, кінцево-діастолічний тиск, швидкість коронарного потоку, частоту серцевих скорочень.

Для дослідження діастолічної жорсткості та залежності сили скорочень лівого шлуночка від його навантаження дозовано збільшували об'єм балончика. Оцінювали зміни діастолічного тиску та тиску, що розвивається (крива Франка – Старлінга). Діастолічну жорсткість міокарда розраховували як відношення приросту діастолічного тиску до приросту об'єму балончика в лівому шлуночку у перерахунку на масу серця.

Для дослідження стану ендотелію коронарних судин оцінювали зміни їх опору у відповідь на введення ацетилхоліну гідрохлориду (10^{-6} моль/л) у коронарне русло ізольованого серця. Об'ємну швидкість коронарного потоку вимірювали за допомогою градуйованих пробірок 5-кратно для отримання стабільного результату. Опір судин визначається як відношення різниці системного артеріального та венозного тиску до об'ємної швидкості кровотоку [7]. Для нашої моделі опір коронарних судин зворотно пропорційний швидкості коронарного потоку.

Для вивчення споживання кисню працюючим серцем вимірювали парціальний тиск кисню у притікаючому та відтікаючому розчині за допомогою газоаналізатора BMS-3 Mk2 ("Radiometer", Данія). Поглинання кисню досліджували за методикою Neely [17]. Роботу серця розраховували як добуток частоти скорочень на силу, що розвивається, кисневу вартість роботи серця – як відношення поглинання кисню до роботи серця.

Результати обробляли методом варіаційної статистики, використовуючи програмне забезпечення Origin 7 фірми "Microcal Software, Inc" (США). Різниця між показниками, яку визначали за допомогою тесту ANOVA (вважали вірогідною при $P < 0,05$. У разі суттєвого підвищення вірогідності на це вказували окремо).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Введення геніпіну не впливало на вміст глюкози у крові щурів з експериментальним

діабетом, який становив $16,2$ ммоль/л $\pm 4,8$ ммоль/л (у щурів контрольної групи – $6,4$ ммоль/л $\pm 0,5$ ммоль/л; у щурів із стрептозо-тоциніндукованим діабетом – $17,5$ ммоль/л $\pm 0,9$ ммоль/л).

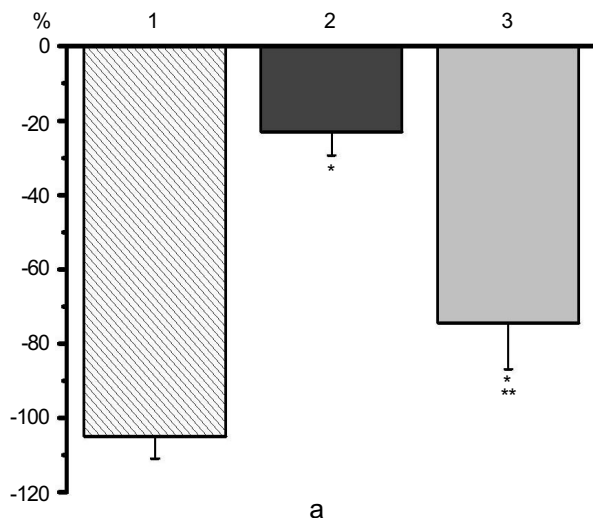
Дослідження ендотелійзалежного розслаблення судинних гладеньких м'язів є одним з розповсюджених методів оцінки стану судинної стінки. Величина та напрямок реакції судин на перфузію ацетилхоліну хлориду дає змогу виявити порушення функціонального стану ендотелію.

За умов експериментального цукрового діабету ендотелійзалежне розслаблення гладеньких м'язів аорти зменшувалося в $4,5$ рази [5]. Після введення геніпіну ендотелійзалежне розслаблення кільцевих препаратів грудного відділу аорти щурів з цукровим діабетом частково відновлювалося. Спостерігалось збільшення цього показника ($74,5$ % $\pm 12,3$ %; рис. 1,а).

Опір коронарних судин сердець контрольних щурів у відповідь на 10-хвилинну перфузію ацетилхоліну хлориду зменшувався на $23,1$ % $\pm 2,8$ %, на що вказувало відповідне збільшення об'ємної швидкості коронарного потоку. Це свідчить про відповідне ендотелійзалежне розслаблення коронарних судин [15]. У щурів з експериментальним цукровим діабетом спостерігалася констрикторна реакція на перфузію ацетилхоліну, що доводило збільшення судинного опору на 21 % $\pm 6,3$ % відповідно до зменшення швидкості коронарного потоку. Після введення блокатора роз'єднувальних протеїнів спостерігалось часткове відновлення ендотелійзалежного розслаблення коронарних судин. У тварин з експериментальним цукровим діабетом, що отримували геніпін, навпаки, спостерігалось збільшення на $2,96$ % $\pm 0,7$ % швидкості коронарного потоку ізольованого за Лангендорфом серця у відповідь на 10-хвилинну перфузію ацетилхоліну. Такий результат є проміжним між значенням для контрольних сердець та сердець щурів з цукровим діабетом (див. рис. 1,б).

Ворітна вена, для якої характерна спонтанна фазна скорочувальна активність, є зручним об'єктом для дослідження залежності довжина – сила скорочень та оцінки жорсткості судинної стінки [6, 12, 19]. Важливою характеристикою судинних гладеньких м'язів є їх здатність збільшувати силу скорочень у відповідь на розтягання, причому ця величина сягає максимальних значень при визначеній довжині, а після перевищення цього максимуму сила скорочень починає зменшуватися. Важливим показником, що характеризує криву довжина – сила судинних гладеньких м'язів є оптимальна довжина, яка відповідає максимальній силі скорочень судинного препарату (L_{max}). У відповідь на розтягання м'язів виникає пасивне напруження, що підтримується еластичними та сполучнотканинними елементами. Загальне напруження стимульованого м'яза складається з суми активної та пасивної складових. Жорсткість судинних гладеньких м'язів є показником, що характеризує переважно пасивну складову напруження ворітної вени та визначається механічними властивостями судинної стінки.

Додаткове розтягання смужок ворітної вени щурів (при вихідному розтягванні



– 2 мН) з силою 2–12 мН призводило до збільшення сили спонтанних фазних скорочень судинних гладеньких м'язів.

Приріст сили скорочень гладеньких м'язів ворітної вени у контрольній групі тварин сягав найбільших значень при силі розтягання 8,5 мН, що відповідало L_{max} . У тварин з цукровим діабетом цей показник істотно зменшувався. Максимальних значень він сягав при збільшенні сили розтягання до 5,5 мН і був в 2,7 раза меншим порівняно з контролем. Тобто L_{max} досяглося при меншій силі розтягання [3].

Після введення щурам геніпіну покращувалися скорочувальні властивості ізольованих препаратів ворітної вени. Збільшувався приріст сили скорочень судинних гладеньких м'язів. Максимальних значень він набував при збільшенні сили розтягання до 7 мН і становив $74,3 \pm 8,4 \%$ відносно вихідного рівня (див. рис. 2,а).

Раніше нами було показано, що у тварин з експериментальним діабетом суттєво збільшується жорсткість судинних гладеньких м'язів ворітної вени порівняно з контрольними тваринами [3].

Нахил кривої, що відображає зміни жорсткості судинних гладеньких м'язів при розтягванні у щурів з діабетом достовірно змен-

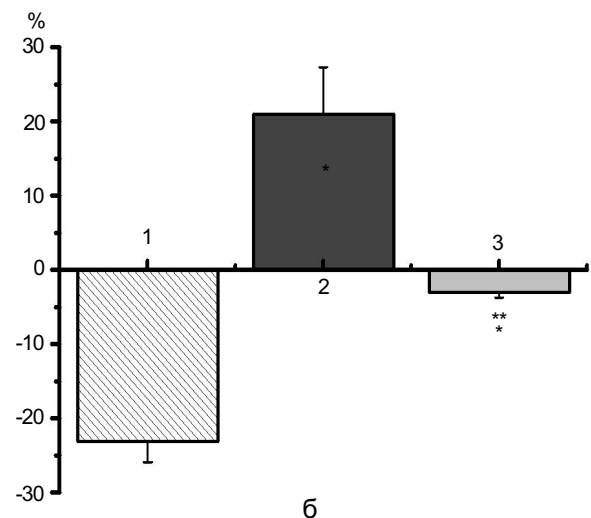


Рис. 1. Ендотелійзалежне розслаблення кільцевих препаратів аорти (а) та ендотелійзалежна дилатація коронарних судин (б) щурів контрольної групи (1), тварин з експериментальним цукровим діабетом (2) та щурів з діабетом, яким було введено геніпін (3). * $P < 0,05$ порівняно з контролем, ** $P < 0,05$ порівняно з діабетом

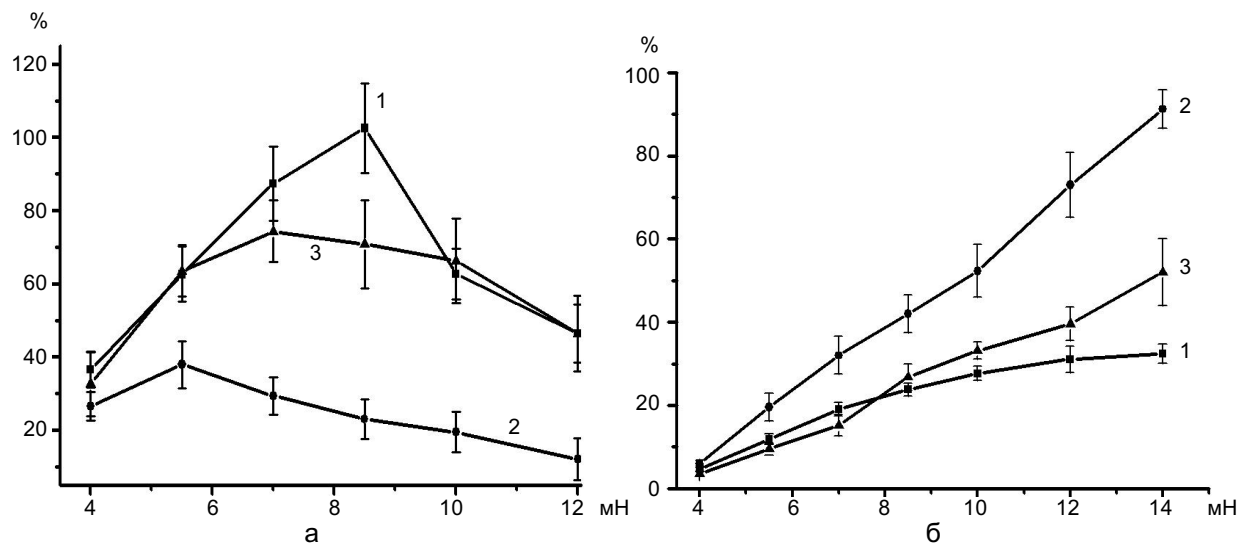


Рис. 2. Зміни сили фазних скорочень (а) та жорсткості (б) судинних препаратів ворітної вени щурів при дозованому розтягуванні: 1 – контрольні тварини; 2 – тварини з цукровим діабетом, 3 – тварини з цукровим діабетом, яким ввели геніпін

шувся після введення геніпіну (див. рис. 2,б).

Отже, у тварин з експериментальним цукровим діабетом спостерігається порушення залежності довжина–сила скорочень судинних гладеньких м'язів і збільшення їх жорсткості. Введення геніпіну призводить до часткового відновлення скорочувальних реакцій судинних гладеньких м'язів ворітної вени та зменшення жорсткості судинної стінки.

Для оцінки скорочувальної функції серця досліджували залежність тиску, що розвивається, та діастолічного тиску лівого шлуночка від навантаження об'ємом. Frank [11] показав, що продуктивність роботи серця підвищується при збільшенні тиску фізіологічного розчину, що розтягує порожнину шлуночка. Ці дані були підтверджені Starling на серцево-легеневому препараті [18]. За сучасними уявленнями саме залежність довжина – сила скорочень є найбільш показовим критерієм функціонального стану серцевого м'яза [2].

За результатами наших досліджень, поступове дозоване навантаження об'ємом лівого шлуночка призводило до збільшення тиску, що розвивається міокардом. Після досягнення максимального значення тиску, що розвивається при подальшому навантаженні спостерігалось «плато». Надалі при

збільшенні об'єму навантаження тиск, що розвивається, починав зменшуватися внаслідок перерозтягнення міокарда. У щурів з експериментальним діабетом спостерігалось скорочення фази «плато». Тобто після досягнення максимального тиску, що розвивається міокардом лівого шлуночка, серця тварин з діабетом витримували значно менше додаткове навантаження, ніж контрольні. Після введення геніпіну спостерігалось часткове відновлення фази «плато» кривої залежності тиску, що розвивається від додаткового навантаження (рис. 3).

Для дослідження жорсткості міокарда оцінювали залежність приросту кінцево-діастолічного тиску від об'єму навантаження лівого шлуночка.

Нахил кривої, що відображає зміни діастолічної жорсткості міокарда лівого шлуночка при дозованому навантаженні об'ємом був достовірно більший для тварин з цукровим діабетом відносно контролю. Після введення геніпіну у щурів з експериментальним діабетом показано зменшення значень кінцево-діастолічного тиску (див. рис. 3).

Таким чином, після введення геніпіну спостерігається часткове відновлення

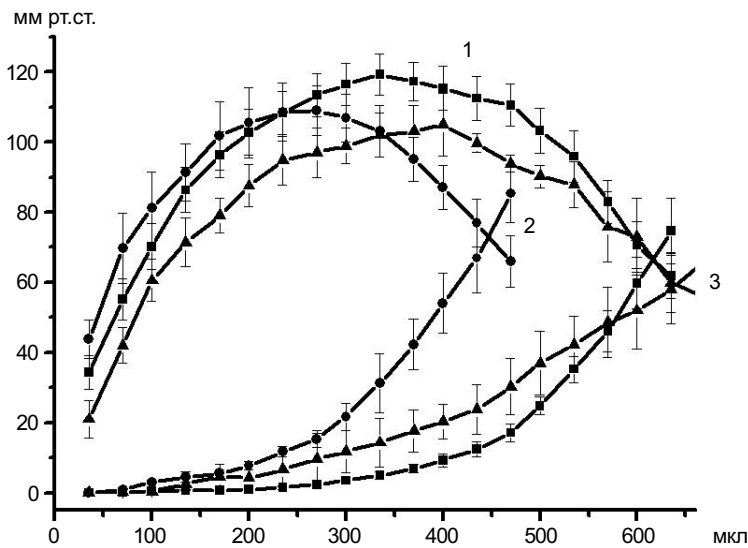


Рис. 3. Залежність тиску, що розвивається у міокарді лівого шлуночка (верхні криві) та кінцево-діастолічного тиску у лівому шлуночку (нижні криві) від його навантаження об'ємом: 1 – контрольні тварини; 2 – тварини з цукровим діабетом, 3 – тварини з цукровим діабетом, яким ввели геніпін

порушених скорочувальних властивостей міокарда лівого шлуночка щурів з стрептозотозиніндукованим цукровим діабетом.

Ефективність використання кисню гладенькими м'язами та міокардом є важливим показником, що характеризує здатність дихального ланцюга мітохондрій до синтезу АТФ відповідно до потреб працюючого м'яза.

У щурів з діабетом, яким ввели геніпін киснева вартість роботи серця становила

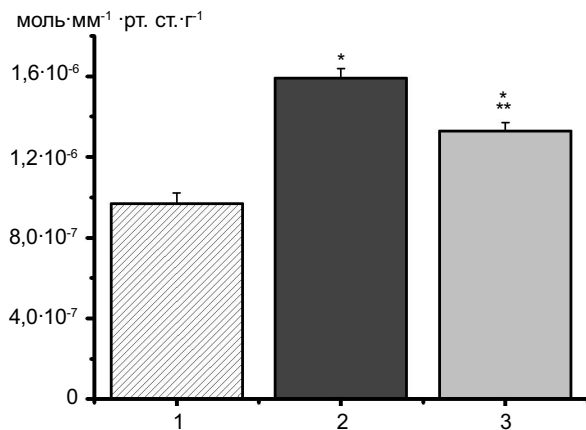


Рис. 4. Киснева вартість роботи міокарда лівого шлуночка. 1 – контрольні тварини; 2 – тварини з цукровим діабетом, 3 – тварини з діабетом, яким ввели геніпін

$(13,3 \pm 0,4) \cdot 10^{-7}$ моль · мм⁻¹ рт. ст. · г⁻¹. Такий результат є проміжним між значеннями для сердець щурів з цукровим діабетом і сердець контрольних щурів (рис. 4).

Отже, введення геніпину сприяє зменшенню кисневої вартості роботи міокарда щурів з експериментальним цукровим діабетом, що може свідчити про нормалізацію роботи дихального ланцюжка мітохондрій із покращенням синтезу АТФ.

Отримані результати вказують на позитивний вплив геніпину на скорочувальні реакції серця та судин, а також ефективність використання кисню за умов експериментального цукрового діабету.

Це свідчить про роль надлишкової експресії роз'єднувальних протеїнів-2 у розвитку порушень скорочувальної функції серцево-судинної системи.

ВИСНОВКИ

1. Введення геніпину призводить до значного відновлення ендотеліозалежних реакцій аорти та коронарних судин у щурів з експериментальним цукровим діабетом.

2. Після введення геніпину щурам з цукровим діабетом спостерігається часткове відновлення скорочувальних реакцій судинних гладеньких м'язів ворітної вени та зменшення жорсткості судинної стінки, відновлення скорочувальних властивостей та покращення розслаблення міокарда лівого шлуночка.

3. Введення геніпину сприяє зменшенню кисневої вартості роботи міокарда у щурів з експериментальним цукровим діабетом.

4. Наведені результати вказують на можливу роль роз'єднувальних протеїнів у розвитку порушень скорочувальних властивостей судин та серця за умов експериментального цукрового діабету.

Стаття надрукована за підтримки Державного фонду фундаментальних досліджень.

O.D.Prysyazhna, V.F.Sagach

THE ROLE OF MITOCHONDRIAL UNCOUPLING PROTEINS IN THE DEVELOPMENT OF CHANGES OF ENDOTHELIUM-DEPENDENT REACTIONS OF HEART AND VESSELS AT EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

The influence of mitochondrial uncoupling protein genipin on endothelium-dependent reaction of vessels, heart contractility and myocardial oxygen consumption was studied at streptozotocin-induced rat model of diabetes mellitus. The partial restoration of damaged at diabetes mellitus vascular reactions as well as decrease of myocardial oxygen consumption has been shown after intraperitoneal injection of genipin. For example, after the introduction of 10 mg/kg genipin were shown a partial restoration of endothelium-dependent dilatation of aorta and coronary vessels, increase of contractive strength-dependent responses of vascular smooth muscle, decrease of portal vein isolated strips stiffness, the improvement of contractive properties and decrease of myocardial stiffness. These data suggest a possible role for mitochondrial uncoupling protein in the development of changes of heart and vascular responses observed at experimental diabetes mellitus.

O.O.Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Браунвальд Е., Росс Дж., Зонненблик Е.Х. Механизмы сокращения сердца в норме и при недостаточности. – М.: Медицина. 1974. – 176 с.
2. Мойбенко О.О., Казьмин С.Г., Сагач В.Ф. Сократимость и сократительная активность миокарда // Фізіол. журн. – 1984. – 30, № 3. – С. 333–342.
3. Присяжна О.Д., Коцюрuba А.В., Ткаченко М.М., Сагач В.Ф. Механізми зміни скорочувальних реакцій та ефективності використання кисню гладенькими м'язами ворітної вени за умов експериментального цукрового діабету // Там само. – 2006. – 52, № 1. – С. 8–16.
4. Сагач В.Ф., Присяжна О.Д., Ткаченко М.М., Коцюрuba А.В. Вплив L-аргініну на функціональну активність ендотелію за умов експериментального цукрового діабету // Там само. – 2005. – 51, № 2. – С. 3–7.
5. Сагач В.Ф., Ткаченко М.М., Присяжна О.Д. та ін. Зміни вазодилататорних реакцій судинних гладеньких м'язів та системи оксиду азоту за умов експериментального цукрового діабету // Там само. – 2003. – 49, № 4. – С. 24–32.
6. Хаютин В.М., Рогоза А.И. Регуляция кровеносных сосудов, порождаемая приложенными к ним меха-

ническими силами. – В кн.: Руководство по физиологии. Физиология кровообращения. Регуляция кровообращения. – Л.: Наука, 1986. – С. 37–66.

7. Хаютин В.М., Рогоза А.Н. Методы исследования кровообращения / Под. ред. Б.И. Ткаченко. Л.: Наука. – 1976. – 275 с.
8. Brown B.P., Heistad D.D. Capacitance of the rabbit portal vein and inferior vena cava // J. Physiol. (London). – 1986. – 381, № 1. – P. 417–425.
9. Cui Y., Xu X., Bi H. et al. Expression modification of uncoupling proteins and MnSOD in retinal endothelial cells and pericytes induced by high glucose: the role of reactive oxygen species in diabetic retinopathy // Exp. Eye Res. – 2006. – 83, № 4. – P. 807–816.
10. Depre C., Young M.E., Ying J. et al. Streptozotocin-induced changes in cardiac gene expression in the absence of severe contractile dysfunction // J. Mol. and Cell. Cardiol. – 2000. – 32, № 6. – P. 985–996.
11. Frank O. Zur Dynamik des Herzmuskels // Z. Biol. – 1895. – 32. – P. 370–437.
12. Johansson B., Mellander S. Static and dynamic components in the vascular myogenic response to passive changes in length as revealed by electrical and mechanical recordings from the rat portal vein // Circulat. Res. – 1975. – 36, № 1. – P. 76–83.
13. Krauss S., Zhang C.Y., Lowell B.B. A significant portion of mitochondrial proton leak in intact thymocytes depends on expression of UCP2 // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2002. – 99, № 1. – P. 118–122.
14. Langendorff O. Untersuchungen am uberlebenden Säugetierherzen // Arch. fur gesam. Physiol. des Menschen und der Thiere. – 1895. – 61. – P. 291–332.
15. Lefroy D.C., Crake T., Uren N.G. et al. Effect of inhibition of nitric oxide synthesis on epicardial coronary artery caliber and coronary blood flow in humans // Circulation. – 1993. – 88, № 1. – P. 43–54.
16. Li B., Nolte L.A., Ju J.S. et al. Skeletal muscle respiratory uncoupling prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice // Nat. Med. – 2000. – 6, № 10. – P. 1115–1120.
17. Neely J.R., Liebermeister H., Battersby E.J., Morgan H.E. Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart // Amer. J. Physiol. – 1967. – 212, № 4. – P. 804–814.
18. Starling E.H. The lecture on the Law of the Heart, given at Cambridge. – In: London: Longmans. – 1915. – 27 p.
19. Vanhoutte P.M. Endothelium-dependent contractions in arteries and veins // Blood Vess. – 1987. – 24, № 3. – P. 141–144.
20. Wang S., Cawthorne M.A., Clapham J.C. Enhanced diabetogenic effect of streptozotocin in mice overexpressing UCP-3 in skeletal muscle // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2002. – 967. – P. 112–119.
21. Zhang C.Y., Parton L.E., Ye C.P. et al. Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced beta cell dysfunction in isolated pancreatic islets // Cell. Metab. – 2006. – 3, № 6. – P. 417–427.

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

Матеріал надійшов до редакції 11.10.2007