

ЕФИМОВ Д.А.

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ имени В.П. Комиссаренко НАМН Украины», г. Киев

МЕХАНИЗМ РАЗВИТИЯ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА

Резюме. В экспериментальном исследовании на 48 крысах изучалась активность Na,K-АТФазы и ацетилхолинэстеразы для выяснения степени и последовательности поражений мембран кардиомиоцитов, возникающих при диабетической кардиомиопатии. Исходя из полученных результатов и литературных данных, сделан вывод, что развитие кардиомиопатии при диабете прежде всего затрагивает транспортные процессы в мембране кардиомиоцита. При длительно текущем диабете наблюдаются нарушения и со стороны холинергической регуляции.

Ключевые слова: кардиомиопатия, сахарный диабет, Na,K-АТФаза, ацетилхолинэстераза.

Поражение сердца при сахарном диабете (диабетическая кардиомиопатия) является непременным атрибутом данного заболевания [1, 2, 10, 12]. По мнению большинства авторов, в основе патогенеза диабетической кардиомиопатии лежат три главных фактора: метаболические нарушения, вегетативная нейропатия и поражение коронарных сосудов.

Молекулярные механизмы развития диабетической кардиомиопатии остаются недостаточно изученными [9, 11]. Для функционирования на молекулярном уровне немаловажное значение имеют натриевые насосы и мембраносвязанная ацетилхолинэстераза (АХЭ). Участие Na,K-АТФазы в возбудимости и метаболизме определяет интерес к состоянию этого энзима в условиях инсулиновой недостаточности [11, 12]. Другой фермент — АХЭ является интегральным показателем не только холинергических процессов, но и медиаторных систем [7, 8].

Целью работы явилось изучение активности этих ферментов в динамике развития диабета у крыс для выяснения степени и последовательности поражений мембран кардиомиоцитов, возникающих при кардиомиопатии.

Материалы и методы исследования

Опыты были проведены на 48 крысах линии Вистар массой 120–150 г. Диабет вызывали путем однократного внутривентрального введения стрептозотоцина (фирма Upjohn, Великобритания, США) в дозе 6 мг/кг. Полученная экспериментальная модель длительно текущего стрептозотоцинового диабета (до 6 месяцев) у крыс была использована для ха-

рактеристики развития диабетических кардиомиопатий. Уровень глюкозы в крови определяли с помощью полосок Dextrostix (фирма Ames) прибором «Айтон» (фирма Ames).

Об изменении функционального состояния кардиомиоцитов судили по активности Na,K-АТФазы и АХЭ. Изучение активности ферментов проводили на мембранах кардиомиоцитов, полученных методом дифференциального центрифугирования.

Определение Na,K-АТФазной активности проводили в растворе следующего состава: 6 мМ MgCl₂, 300 мМ NaCl, 60 мМ KCl (pH = 7,4).

Концентрация АТФ равнялась 30 мМ. Общий объем пробы 1,5 мл. После 15 мин инкубации при 37° реакцию останавливали добавлением 1,0 мл 10% ТХУ. Неорганический фосфор в пробах определяли по методу [6], содержание белка — по [4].

Na,K-АТФазную активность рассчитывали, вычитая из общей АТФазной активности Mg²⁺-зависимую, и определяли в присутствии 10⁻³ М строфантина К. Активность АХЭ определяли по методу [7] в нашей модификации.

Изучение активности ферментов проводили у контрольных животных, спустя одну неделю после введения крысам стрептозотоцина, через 2–3 недели и при длительно текущем диабете (6 месяцев). Полученные результаты обрабатывали статистически по методу [3].

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты опытов представлены в табл. 1. У контрольных (здоровых) крыс активность Na,K-АТФазы со-

ставляла 30,62 мкМР/мг белка/ч, АХЭ — 8,6 мкМ укс. к-ты/мг белка/ч. Через 7 дней после введения стрептозотоцина происходило достоверное снижение натриевого насоса, в то время как второй фермент оставался в пределах нормы. В процессе развития диабета (величина сахаров до 11,1–16,6 ммоль/л) спустя 2–3 недели Na, К-АТФаза была заторможена почти на 45 % (в 1,7 раза) от исходного уровня. В это же время активность АХЭ имела некоторую тенденцию к повышению. При длительно текущем диабете значительные изменения претерпевает как натриевый насос, так и активность АХЭ, которая увеличивалась в 4 раза по сравнению с контролем.

Таким образом, при развитии диабетической кардиомиопатии у крыс прослеживаются две закономерности. Во-первых, с начала возникновения диабета прежде всего угнетается миокардиальный натриевый насос, в то же время активность АХЭ меняется только при длительно текущем диабете. Во-вторых, степень выраженности наблюдаемых изменений зависит от продолжительности диабета. Подобная корреляция наблюдается и в клинических исследованиях, в которых найдена большая зависимость от продолжительности диабета, чем от его тяжести [1, 2].

Гистохимически и электронно-микроскопически установлено, что и проводящей системе сердца, и парасимпатическим — холинергическим нервным окончаниям, подходящим к миоцитам, свойственна отчетливая активность АХЭ, сходная с таковой в нервной ткани [8].

Согласно современным исследованиям, нарушение сердечной деятельности при сахарном диабете может быть вызвано расстройством нервной регуляции сердца на почве диабетической вегетативной нейропатии [12]. При этом поражаются ветви парасимпатической и симпатической нервной системы, причем поражения со стороны блуждающего нерва происходят раньше, чем симпатических нервов сердца [1, 2, 12].

При развитии диабетической кардиомиопатии у крыс в экспериментах наблюдались измене-

ния активности АХЭ, однако достоверными они были только при длительно текущем диабете. Таким образом, прослеживается прямая зависимость изменения активности фермента от длительности заболевания. Однако наиболее чувствительной к условиям инсулиновой недостаточности оказалась Na,К-АТФаза. Уже с первых дней развития диабета выявлено значительное снижение активности натриевого насоса.

В литературе на этот счет имеется несколько точек зрения. Одни считают, что при развитии диабета у животных способность миоцитов связывать убаин не изменяется по сравнению с нормой. Только латентная активность АТФазы, определяемая после обработки мембран аламетицином или DOX-Na, значительно снижена у животных с диабетом [7]. Полагают, что диабет не приводит к изменению числа молекул Na,К-АТФазы, но вызывает снижение сродства К-активируемых центров фермента к K⁺ [7].

Есть факты, говорящие о том, что через 4–6 недель на фоне стабильного стрептозотоцинового диабета на срезах желудочков миокарда крыс значительно снижался строфантин G-чувствительный захват 86 Rb, что свидетельствует об угнетении натриевого насоса. Инсулин при добавлении к среде или введении животным полностью восстанавливает активность натриевого насоса [9]. Отсюда авторы делают заключение, что угнетение натриевого насоса при сахарном диабете связано с недостаточностью инсулина.

По современным представлениям, при развивающейся кардиомиопатии большое значение придается роли Ca⁺⁺ [9]. Повышение проницаемости клеточных мембран для ионов Ca⁺⁺ и Na⁺ обладает способностью снижать функциональную активность Na,К-АТФазы, что сопровождается увеличением содержания в клетках миокарда Na⁺ и уменьшением концентрации K⁺. Это в итоге приводит к повышению возбудимости миокарда. Уменьшение содержания K⁺ в клетках усугубляется тем, что в условиях сниженной функциональной активности Na,К-АТФазы, уменьшения концентрационного

Таблица 1. Активность Na,К-АТФазы и АХЭ плазматических мембран кардиомиоцитов диабетических крыс

| Статистические показатели | Активность ферментов | | | | | | | |
|---------------------------|----------------------|-------------------------------|------------|---------|----------|-----------------------------|------------|---------|
| | Контроль | Na, К-АТФаза, мкмоль/мг белка | | | Контроль | АХЭ, мкМ укс. к-ты/мг белка | | |
| | | Стрептозотоциновый диабет | | | | Стрептозотоциновый диабет | | |
| | | 1 неделя | 2–3 недели | Длит. | | 1 неделя | 2–3 недели | Длит. |
| М | 30,62 | 18,0 | 13,75 | 13,51 | 8,60 | 6,34 | 11,37 | 33,63 |
| n | 15 | 15 | 16 | 18 | 17 | 15 | 17 | 15 |
| u | | 1 | 0 | 0 | | 6 | 16 | 0 |
| p | | < 0,005 | < 0,005 | = 0,001 | | > 0,05 | > 0,05 | = 0,001 |

градиента Na^+ и угнетения Na-Ca -ионообменного механизма, а также повышения содержания внутриклеточного Ca^{++} , часть ионов Na^+ , предназначенных для обмена на K^+ , расходуется на обмен с Ca^{++} . Эти механизмы дополнительно способствуют снижению содержания внутриклеточного K^+ .

Подобное нарушение проницаемости мембран миокарда становится фактором риска развития кардиомиопатий. Кроме того, оно способствует возникновению условий повышения тонуса блуждающего нерва.

Однако есть мнение о том, что препараты саркоплазматического ретикулума, выделенные из сердца нормальных крыс и животных с диабетом электронно-микроскопически, не отличаются по активности убаинчувствительной Ca^+ , Mg^+ -АТФазы, азидчувствительной Ca^+ , Mg^+ -АТФазы и способности к азидчувствительному поглощению Ca^+ [2].

Была проверена последовательность возникновения изменений активности ряда ферментов и Ca^{++} -связывающей способности ретикулума при развитии кардиомиопатий. В первую очередь обнаруживалось снижение активности Na, K-ATPase сарколеммы, а затем скорости накопления Ca^{++} ретикуломом. В этот же период нарушается и Ca -связывающая способность митохондрий, а Ca-ATPase , базальная и F-стимулируемая аденилатциклаза тормозят на более поздних стадиях. Исходя из этих результатов, авторы пришли к заключению, что в развитии кардиомиопатии участвуют различные мембранные системы, но первым проявлением болезни является снижение активности Na, K-ATPase (сарколеммы).

Таким образом, исходя из наших и литературных данных, можно заключить, что развитие кардиомиопатии при диабете прежде всего затрагивает транспортные процессы в мембране кардиомиоцита. При длительно протекающем диабете наблюдаются нарушения и со стороны холинергической регуляции.

Список литературы

1. Ефимов А.С., Скробонская Н.А. Клиническая диабетология. — К.: Здоров'я, 1998. — 320 с.
2. Балаболкин М.И. Диабетология. — М.: Медицина, 2000. — 672 с.
3. Гублер А.М., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л., 1979. — 141 с.
4. Шаткин А.А. Колориметрические методы определения ДНК, РНК и белка // Методы вирусологии и молекулярной биологии. — М.: Мир, 1972. — С. 187-189.
5. Меньшиков В.В., Делекторская Л.М. Лабораторные методы исследования в клинике. — М.: Медицина, 1987. — 368 с.
6. Fiske C.H., Subbarow I. The colometric determination of phosphorus // I. Biological Chem. — 1926. — Vol. 66. — P. 375-377.
7. Болдырев А.А. $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -зависимая АТФаза // Успехи физиол. наук. — 1981. — Т. 12. — С. 91-130.
8. Голиков С.Н., Долго-Сабуров В.В. и др. Холинергическая регуляция биохимических систем. — М.: Медицина, 1985. — 224 с.
9. Болдырев А.А., Твердислов В.А. Молекулярная организация и механизм функционирования Na -насоса // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. — М.: ВИНТИ, 1978. — Т. 10.
10. Боднар П.М. Сердце при сахарном диабете // Пробл. эндокринологии. — 1987. — № 4. — С. 77-81.
11. Древаль А.В. Сахарный диабет как первичная генерализованная патология активного трансмембранного транспорта глюкозы (новая концепция) // Вопросы питания. — 1991. — № 3. — С. 4-9.
12. Гончар І.В., Нещерет О.П., Хомазюк А.І. Порушення адренергічної регуляції енергетичного метаболізму міокарда при експериментальному цукровому діабеті // Ендокринологія. — 1996. — Т. 1, № 2. — С. 30-38.

Получено 16.03.12 □

Ефимов Д.А.

ДУ «Інститут ендокринології і обміну речовин імені В.П. Комісаренка НАМН України», м. Київ

МЕХАНІЗМ РОЗВИТКУ ДІАБЕТИЧНОЇ КАРДІОМІОПАТІЇ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТУ

Резюме. В експериментальному дослідженні на 48 щурах вивчалася активність Na, K-ATPase й ацетилхолінестерази для з'ясування ступеня і послідовності уражень мембран кардіомиоцитів, що виникають при діабетичній кардіомиопатії. Виходячи з отриманих результатів і літературних даних, зроблено висновок, що розвиток кардіомиопатії при діабеті перш за все зачіпає транспортні процеси в мембрані кардіомиоциту. При тривалому діабеті спостерігаються порушення і з боку холинергічної регуляції.

Ключові слова: кардіомиопатія, цукровий діабет, Na, K-ATPase , ацетилхолінестераза.

Yefimov D.A.

SI «Institute of Endocrinology and Metabolism named after V.P. Komissarenko of NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine

MECHANISM OF EXPERIMENTAL DIABETIC CARDIOMYOPATHY DEVELOPMENT

Summary. In experiment on 48 rats Na, K-ATPase and acetylcholinesterase activity was investigated in order to study the intensity and subsequence of cardiomyocyte membrane injuries induced by diabetic cardiomyopathy. The results and literature data allow conclude that diabetes-induced cardiomyopathy firstly affect transport processes in cardiomyocyte membrane. Long-term diabetes mellitus is associated with impaired cholinergic regulation.

Key words: cardiomyopathy, diabetes mellitus, Na, K-ATPase , acetylcholinesterase.