

Ю.О. Атаман

Активність прокальциногенних і антикальциногенних ектоферментів у стінках артерій і вен кролів з аллоксановим діабетом

Медичний інститут Сумського державного університету

Ключові слова: аллоксановий діабет, ектонуклеотидази, лужна фосфатаза, артерії, вени.

Розвиток цукрового діабету часто ускладнюється кальцифікацією артерій – артеріосклерозом Менкеберга. Цей процес може бути зумовлений порушенням балансу між факторами судинної стінки, які сприяють (прокальциногенні) і перешкоджають (антикальциногенні) відкладанню солей кальцію в тканинах. Антикальциногенні властивості в судинній стінці виявляє пірофосфат (PP_i), концентрація якого залежить від активності ектоферментів – ектонуклеотидаз і лужної фосфатази. Ектонуклеотидази гідролізують позаклітинні аденинові нуклеотиди і є основним джерелом PP_i у судинах. Лужна фосфатаза руйнує PP_i і зменшує вміст цієї сполуки в тканинах. Зміна співвідношення між цими ферментами може вести до зменшення концентрації PP_i в судинній стінці і бути причиною її кальцифікації.

Активность прокальциногенных и антикальциногенных эктоферментов в стенках артерий и вен кроликов с аллоксановым диабетом

Ю.А. Атаман

Развитие сахарного диабета часто осложняется кальцификацией артерий – артериосклерозом Менкеберга. Этот процесс может быть обусловлен нарушением баланса между факторами сосудистой стенки, которые способствуют (прокальциногенные) и препятствуют (антикальциногенные) отложению солей кальция в тканях. Антикальциногенные свойства в сосудистой стенке проявляет пирофосфат (PP_i), концентрация которого зависит от активности эктоферментов – эктонуклеотидаз и щелочной фосфатазы. Эктонуклеотидазы гидролизуют внеклеточные адениновые нуклеотиды и являются основным источником PP_i в сосудах. Щелочная фосфатаза разрушает PP_i и уменьшает содержание этого соединения в тканях. Изменение соотношения между этими ферментами может приводить к уменьшению концентрации PP_i в сосудистой стенке и быть причиной ее кальцификации.

Ключевые слова: аллоксановый диабет, эктонуклеотидазы, щелочная фосфатаза, артерии, вены.

Патология. – 2010. – Т.7., №1. – С. 17-20

Activity of procalcigenic and anticalcigenic ectoenzymes in arterial and venous walls of rabbits with alloxan diabetes

Y.O. Ataman

Diabetes development is often complicated by arterial calcification i.e. Monckeberg's arteriosclerosis. This process can be caused by disbalance between factors of a vascular wall which promote (procalcigenic) and interfere (anticalcigenic) with deposit of calcium salts in tissues. Anticalcigenic properties in a vascular wall are presented by pyrophosphate (PP_i) which concentration depends on activity of ectoenzymes – ectonucleotidases and alkaline phosphatase. Ectonucleotidases hydrolyze extracellular adenine nucleotides and are the main source of PP_i in blood vessels. The alkaline phosphatase breaks down PP_i and reduces the content of this compound in tissues. The change of interrelation between these enzymes can result in reduction of PP_i concentration in the vascular wall and cause its calcification.

Key words: alloxan diabetes, ectonucleotidases, alkaline phosphatase, arteries, veins.

Pathologia. 2010; 7(1): 17-20

Серед уражень кровоносних судин, що супроводжують розвиток цукрового діабету і визначають тяжкі його ускладнення, чільне місце посідає кальцифікація артерій, відома як артеріосклероз Менкеберга. Після того як з'ясувалося, що даний різновид склерозу судин розвивається у хворих на цукровий діабет так само часто, як і «класичний» атеросклероз, увага вчених зосередилася на клітинних і молекулярних механізмах кальцифікації судин [5,7,9]. У проведених дослідженнях було виявлено місцеві чинники судинної стінки, які сприяють (прокальциногенні) і перешкоджають (антикальциногенні) відкладанню солей кальцію в структурах артерій [3,14].

Показано, що у фізіологічних умовах рівень кальцію і неорганічного фосфату в сироватці крові і міжклітинній рідині є достатнім для утворення і відкладання фосфату кальцію з подальшим формуванням гідроксіапатиту. Проте, в нормі цьому процесу перешкоджає висока концентрація в тканинах судин пірофосфату (PP_i),

рівень якого в судинній стінці визначається процесами його утворення і деградації. Основним джерелом утворення PP_i є позаклітинний АТФ, який під впливом ектонуклеотидаз-ферментів, умонтованих у плазматичну мембрану клітин (ендотеліоцитів, гладких м'язових клітин), – зазнає гідролітичного розщеплення з вивільненням PP_i і АМФ. Утворений у такий спосіб PP_i стає субстратом для лужної фосфатази, яка, гідролізуючи його, зумовлює зменшення концентрації в тканинах PP_i , відповідно, зростання рівня неорганічного фосфату. Таким чином, можна вести мову про те, що рівень PP_i у судинній стінці визначається співвідношенням активності двох груп ферментів: (1) ектонуклеотидаз, які через збільшення вмісту PP_i перешкоджають кальцифікації, а отже, є антикальциногенними, і (2) лужної фосфатази, яка, зменшуючи концентрацію PP_i у тканинах і збільшуючи утворення неорганічного фосфату, сприяє мінералізації судинної стінки, тобто є прокальциногенним ферментом.

Сьогодні ще не з'ясовано, як змінюється активність зазначених вище ферментів під впливом цукрового діабету та пов'язаних з ним чинників. Аби підійти до розв'язання цього питання, нами проведено вивчення ектонуклеотидазної активності й активності лужної фосфатази в стінках артерій і вен кролів з алоксановим цукровим діабетом.

Мета роботи: з'ясування впливу алоксанового цукрового діабету на активність антикальциногенних (ектонуклеотидази) і прокальциногенних (лужна фосфатаза) ферментів у тканинах кровоносних судин кролів.

Матеріали і методи

Досліди виконано на 12 кролях-самцях віком 6 міс., маса яких становила 2,0–2,2 кг. Тварин було поділено на дві групи (по 6 у кожній): інтактні кролі та дослідні тварини з алоксановим діабетом. Дослідження проводили з дотриманням Міжнародних принципів «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 18 березня 1986 р.).

Цукровий діабет відтворювали одноразовим внутрішньовенним введенням тваринам алоксану (SIGMA Aldrich) з розрахунку 100 мг на 1 кг маси. Алоксан вводили в ізотонічному розчині натрію хлориду (загальний об'єм розчину складав 5 мл) у крайову вену вуха кролів, що були позбавлені їжі протягом 18 год. Контрольним тваринам внутрішньовенно вводили таку ж кількість ізотонічного розчину NaCl.

Контроль концентрації глюкози в крові здійснювали перед початком експерименту, через 3, 7 і 14 діб. Глюкозу крові визначали за допомогою експрес-аналізатора «GLUCOCARD» (Arkray, Японія). У дослідну групу відбирали тільки тих кролів, у яких рівень базальної глікемії перевищував 10 ммоль/л через 3 дні після ін'єкції алоксану.

Через 14 днів після введення алоксану тварин забивали за допомогою повітряної емболії. Одразу після забою виділяли грудну і черевну аорту, легеневу артерію, задню порожнисту вену. З кожної виділеної судини формували по чотири поздовжні смужки, що йшли на визначення одного з ферментів: екто-АТФази, екто-АДФази, екто-АМФази, лужної фосфатази.

Ектонуклеотидазну активність ізольованих стрічок артерій і вен визначали в умовах їх інкубації протягом 15 хв при 37°C у розчині Кребса, у якому K_2HPO_4 був заміщений еквівалентною кількістю KCl. В інкубаційне середовище додавали один з аденінових нуклеотидів (АТФ, АДФ, АМФ) з таким розрахунком, щоб концентрація його в розчині становила 0,02 моль/л. Активність ектонуклеотидаз оцінювали за приростом концентрації неорганічного фосфату, що вивільнюється в середовище за час інкубації. Вміст останнього в розчині вимірювали за утворенням молібденової сині у присутності молібдату амонію і аскорбінової кислоти [6]. Для порівняння окремих судин між собою розрахунок ектонуклеотидазної активності здійснювали як на одиницю маси тканини, так і на одиницю площі поверхні судинних стрічок.

Активність лужної фосфатази препаратів судин визначали в умовах їх інкубації в гліциновому буфері протягом 30 хв. при 37°C з додаванням як субстрату реакції р-нітрофенілфосфату. Активність ферменту оцінювали за кількістю утвореного за одиницю часу р-нітрофенолу, вміст якого в розчині визначали фотометрично за оптичною щільністю зразка при 405 нм [4].

Одержані результати опрацьовано з використанням стандартних методів варіаційної статистики і представлено у вигляді $M \pm m$ (середня \pm похибка середньої) [2]. Достовірність відмінностей оцінювали за критерієм т Стьюдента.

Таблиця

Активність ектонуклеотидаз і лужної фосфатази в ізольованих стрічках кровоносних судин у кролів з алоксановим діабетом

	Ектонуклеотидази			Лужна фосфатаза
	Екто-АТФаза	Екто-АДФаза	Екто-АМФаза	
Грудна аорта				
контроль (6)	3,25 \pm 0,28	1,36 \pm 0,1	0,44 \pm 0,03	7,3 \pm 0,66
алоксан (6)	2,37 \pm 0,3	0,94 \pm 0,1*	0,32 \pm 0,04*	13,2 \pm 0,9*
Черевна аорта				
контроль	2,53 \pm 0,21	1,42 \pm 0,12	0,56 \pm 0,07	6,5 \pm 0,65
алоксан	1,95 \pm 0,11*	1,13 \pm 0,09	0,42 \pm 0,04	13 \pm 1,06*
Легенева артерія				
контроль	3,43 \pm 0,22	1,93 \pm 0,32	1,06 \pm 0,07	4,2 \pm 0,43
алоксан	2,73 \pm 0,1*	1,55 \pm 0,1	0,8 \pm 0,06*	5,3 \pm 0,66
Задня порожниста вена				
контроль	4,3 \pm 0,35	2,89 \pm 0,32	1,63 \pm 0,12	2,3 \pm 0,31
алоксан	3,14 \pm 0,15*	1,82 \pm 0,11*	0,96 \pm 0,11*	3,2 \pm 0,53

Примітка. Дані представлено як «середня \pm похибка середньої»; активність ектонуклеотидаз – в мкмоль P_i ($\text{cm}^2 \text{ год}^{-1}$), лужної фосфатази – в мкмоль р-нітрофенолу $\text{г}^{-1} \text{ год}^{-1}$; у дужках – кількість тварин; * – $p < 0,001$.

Результати та їх обговорення

Однократне введення кролям алоксану (100 мг/кг) супроводжується значним підвищенням концентрації глюкози в крові, що відображає розвиток у тварин цукрового діабету. Так, рівень базальної глікемії у них становив (у ммоль/л) через 3 доби $21,3 \pm 0,73$; через 7 діб – $19,1 \pm 0,72$; через 14 діб – $17,8 \pm 0,76$ проти $4,4 \pm 0,13$ на початку експерименту ($p < 0,001$). Максимальний рівень гіперглікемії відзначали через 3 доби після введення алоксану, що є характерним для даної моделі цукрового діабету [12].

Через 14 днів після введення алоксану відзначали зменшення ектонуклеотидазної активності у всіх вивчених артеріях і венах (див. табл.), щоправда, кожна з судин характеризувалася своїми особливостями. Так, у грудній аорті мало місце статистично значиме зменшення активності екто-АДФази і екто-АМФази (відповідно на 31 і 27%), у черевній аорті – тільки екто-АТФази (на 23%), у легеневій артерії – екто-АТФази і екто-АМФази (на 20 і 25%), у задній порожнистій вені – усіх ектонуклеотидаз: екто-АТФази (на 27%), екто-АДФази (на 37%), екто-АМФази (на 41%).

Водночас відзначали підвищення активності лужної фосфатази в аортальній стінці діабетичних кролів. Так, цей показник збільшувався в грудній аорті на 81%, а в черевній – рівно вдвічі. У двох інших судинах – легеневій артерії і задній порожнистій вені – активність лужної фосфатази не змінювалася.

Нині є всі підстави вважати, що розвиток кальцифікації судин відбувається тільки тоді, коли порушується баланс між чинниками, що ініціюють кальцифікацію, і факторами, що захищають судинну стінку від відкладання солей кальцію.

До останніх належать неорганічний пірофосфат (PP_i), матриксний білок MGP (matrix Gla protein), фетуїн, остеопонтин, остеопротегерин, внутрішньоклітинні інгібітори (Smad6, Dkk1), остеокластоподібні клітини судинної стінки [3,14].

PP_i є фізіологічним субстратом для тканинної неспецифічної лужної фосфатази, локалізованої в мембранах матриксних везикул і кальцифікуючих судинних клітин – структур, що започатковують процеси мінералізації в судинній стінці. Цей ектофермент, гідролізуючи PP_i , створює довкола високу концентрацію неорганічного фосфату, що істотно пришвидшує відкладення солей кальцію [15].

Сьогодні відомими є два механізми генерування PP_i у судинній стінці. Перший з них – внутрішньоклітинний – пов'язаний з мембранним транспортним білком ANK, що переміщує утворений усередині клітин PP_i назовні [8,10,15]. Другий – позаклітинний – здійснюється за участю ектоферменту ENPP1 (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase I), який розщеплює позаклітинні нуклеозидтрифосфати, зокрема АТФ, з утворенням PP_i [10,15]. Вважають, що саме другий механізм генерування PP_i є провідним. З урахуванням цього можна стверджувати, що концентрація PP_i в позаклітинному середовищі, в

основному, залежить від активності двох ектоферментів: ENPP1, що генерує PP_i , і лужної фосфатази, що його гідролізує. Перший переважно міститься в плазматичних мембранах ГМК, другий – в мембранах матриксних везикул і кальцифікуючих судинних клітин.

Основний механізм інгібіторної дії PP_i пов'язаний з його фізично-хімічними властивостями, завдяки яким порушується нуклеація і ріст кристалів оксіапатиту (хелатороподібна дія). Крім цього, останнім часом виявлено й інші напрями його гальмівного впливу на кальцифікацію. Зокрема показано, що PP_i пригнічує трансдиференціювання судинних гладких м'язових клітин (ГМК) в хондроцити, а також посилює утворення ще одного антикальциногенного чинника – остеопонтину [15]. PP_i необхідний для стабілізації фенотипу ГМК. Судинні ГМК, які не спроможні генерувати насичене PP_i оточення, зазнають остео/хондрогенної метаплазії [10].

Порушення утворення PP_i або через дефіцит ANK, або через зменшення активності ENPP1 спричиняється до масивної кальцифікації артерій. Така кальцифікація розвивається у мишей з генетично зумовленим дефіцитом ENPP1 ($NPP1^{-/-}$ mice) і у людей з таким же генетичним дефектом [10]. Останній клінічно виявляє себе спадковою хворобою – дитячою «ідіоматичною» кальцифікацією артерій [13].

Деякі чинники, зокрема окиснені ліпопротеїни низької густини і оксистероли, здатні збільшувати активність лужної фосфатази в судинній стінці [11]. За цих обставин розвиткові кальцифікації сприяє те, що лужна фосфатаза, з одного боку, вивільнює неорганічний фосфат (P_i) з органічних фосфоровмісних сполук, постачаючи субстрат для утворення оксіапатиту, а з другого боку – гідролізує PP_i , що є паракринним інгібітором хрящової метаплазії ГМК і мінералізації [8]. Якщо компенсаторне збільшення активності ENPP1 і ANK-залежної секреції PP_i не є адекватним підвищенню активності лужної фосфатази, розвивається кальцифікація судинної стінки. З огляду на це виділяють два можливі напрями запобігання мінералізації судин: (1) селективне інгібування лужної фосфатази і (2) підвищення активності ENPP1 і ANK-механізму [8,10].

У виконаних нами дослідженнях вивчалася загальна ектонуклеотидазна активність, яка опосередковано може свідчити про активність ENPP1. Виявлене зменшення ектонуклеотидазної активності у всіх вивчених судинах діабетичних тварин дає підстави стверджувати тезу про зниження здатності структур судинної стінки гідролізувати позаклітинні аденінові нуклеотиди (АТФ, АДФ, АМФ).

Водночас, на тлі пригнічення ектонуклеотидазної активності спостерігали зростання активності лужної фосфатази в стінках грудної і черевної аорт. Таким чином, у цих судинах має місце порушення балансу між антикальциногенними (ектонуклеотидази) і прокальциногенними (лужна фосфатаза) ферментами, що створює сприятливі умови для подальшої кальцифікації зазначених артерій у тварин з алоксановим діабетом.

Натомість у двох інших вивчених судинах – легеневій артерії і задній порожнистій вені – активність лужної фосфатази у діабетичних тварин не змінюється. Цю обставину слід оцінювати як чинник, що перешкоджає кальцифікації судинної стінки. З літературних джерел відомо, що саме ці судини є досить стійкими до розвитку дистрофічно-склеротичних уражень і відкладання солей кальцію [1].

Отже, можна дійти висновку, що алоксановий діабет створює в стінках чутливих до артеріосклерозу судин (грудна і черевна аорта) передумови для накопичення кальцію і фосфатів з наступним обвапненням судинної стінки. Проте, чи достатні ці чинники для розвитку уражень менкебергівського типу – ще треба довести. Подальшого вивчення вимагає і участь інших про- та анти-кальциногенних факторів у патогенезі макроангіопатій, притаманних цукровому діабету.

Висновки

Розвиток алоксанового діабету у кролів супроводжується зменшенням ектонуклеотидазної активності артеріальних і венозних судин.

Для алоксанового діабету характерне збільшення активності лужної фосфатази в стінках грудної і черевної аорт – судин, чутливих до розвитку артеріосклерозу Менкеберга, тим часом як у судинах, стійких до дистрофічно-склеротичних уражень (легенева артерія, задня порожниста вена), активність цього ферменту залишається без змін.

Порушення балансу між антикальциногенними (ектонуклеотидази) і прокальциногенними (лужна фосфатаза) ферментами може створювати умови для подальшої кальцифікації судинної стінки.

Література

1. *Быць Ю.В.* Сравнительно-патологические аспекты энергообеспечения сосудистой стенки / Ю.В. Быць, В.П.Пишак, А.В.Атаман – К. – Черновцы: Прут, 1999. – 330с.
2. *Лакин Г.Ф.* Биометрия / Г.Ф. Лакин – М.:Высшая школа, 1990. – 352 с.
3. *Abedin M.* Vascular calcification. Mechanisms and clinical ramifications / M. Abedin, Y. Tintut, L.L. Demer // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*– 2004.– V.24.– P. 1161-1170.
4. *Bessey O.A.* A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum / O.A. Bessey, O.H. Lowry, M.J. Brock // *J. Biol. Chem.*– 1946.– V. 164.– P. 321-329.
5. *Budoff M.J.* Diabetes and progression of coronary calcium under the influence of statin therapy / M.J. Budoff, D. Yu, K. Nasir [et al.] // *Am. Heart J.*– 2005.– V.149.– P. 695-700.
6. *DuBois K.P.* Assay of animal tissues for respiratory enzymes: adenosine triphosphatase / K.P. DuBois, V.R. Potter // *J. Biol. Chem.*– 1943.– V. 150.– P.185-195.
7. *Fadini G.P.* The good and the bad in the link between insulin resistance and vascular calcification / G.P. Fadini, P. Pauletto, A. Avogaro, M. Rattazzi // *Atherosclerosis.*– 2007.– V.193.– P. 241–244.
8. *Harmey D.* Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by AKP2, ENPP1, and ANK: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders / D. Harmey, L. Hessle, S. Narisawa [et al.] // *Am. J. Pathol.*– 2004.– V.164.– P. 1199-1209.
9. *Hayden M.R.* Vascular ossification – calcification in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, chronic kidney disease, and calciphylaxis – calcific uremic arteriopathy L. Kolb [et al.] // *Cardiovascular. Diabetologia.*– 2005.– V.4.– P. 4-20.
10. *Johnson K.* Chondrogenesis mediated by PPi depletion promotes spontaneous aortic calcification in NPP1-/- mice / K. Johnson, M. Polewski, D. van Etten, R. Terkeltaub // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*– 2005.– V.25.– P. 686-691.
11. *Kha H.T.* Oxysterols regulate differentiation of mesenchymal stem cells: pro-bone and anti-fat / H.T. Kha, B. Basseri, D. Shouhed [et al.] // *J. Bone Miner. Res.*– 2004.– V.19.– P. 830-840.
12. *Lenzen S.* The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes / S. Lenzen // *Diabetologia.*– 2008.– V.51.– P.216-226.
13. *Ruf N.* The mutational spectrum of ENPP1 as arising after the analysis of 23 unrelated patients with generalized arterial calcification of infancy (GACI) / N. Ruf, B. Uhlenberg, R. Terkeltaub // *Hum. Mutat.*– 2005.– V.25.– P. 98.
14. *Shao J.S.* Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta / J.S. Shao, J. Cai, D.A. Towler // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*– 2006.– V.26.– P. 1423-1430.
15. *Towler D.A.* Inorganic pyrophosphate. A paracrine regulator of vascular calcification and smooth muscle phenotype / D.A. Towler // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*– 2005.– V.25.– P. 651-654.

Відомості про автора:

Атаман Юрій Олександрович, к.м.н., асистент кафедри внутрішньої медицини Сумського державного університету.

Адреса для листування:

40034, м. Суми, вул. Черепіна, 68-б, кв. 4, E-mail: ata_kard@ukr.net