

ІНТЕНСИВНІСТЬ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ І АНТИОКСИДАНТНА ФЕРМЕНТНА АКТИВНІСТЬ У СТІНКАХ АРТЕРІЙ І ВЕН КРОЛІВ З АЛОКСАНОВИМ ДІАБЕТОМ

Ю.О. Атаман

Сумський державний університет

Показано, що розвиток алоксанового діабету у кролів супроводжується збільшенням вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів (гідропероксидів ліпідів, шиффових основ) у стінках артеріальних і венозних судин. Водночас відзначається зменшення активності антиоксидантних ферментів (глутатіонпероксидази, супероксиддисмутази) у тканинах вивчених кровоносних судин.

Ключові слова: алоксановий діабет, пероксидне окиснення ліпідів, артерії, вени.

Серед численних порушень обміну речовин, притаманних цукровому діабету (ЦД), велике значення у розвитку як самої хвороби, так і її ускладнень надають активації вільнорадикальних процесів – оксидативному стресу [1–4]. Цей універсальний механізм ушкодження біологічних структур має пряме відношення до формування атеросклеротичних уражень кровоносних судин, у тому числі й діабетичного походження [5, 6]. Сьогодні відомо, що в розвитку атеросклерозу важливу роль відіграють як окисна модифікація білків плазми крові – ліпопротеїнів, так і активація пероксидного окиснення ліпідів (ПОС) у самій артеріальній стінці [7–10].

Вплив ЦД на артеріальні судини не обмежується атеросклеротичним процесом: у багатьох хворих на діабет 1-го і 2-го типів виявляють кальцифікацію середнього шару судинної стінки, тобто ознаки артеріосклерозу Менкеберга [11–14]. Існує думка, що розвиток цього різновиду діабетичної макроангіопатії має у своїй основі ушкодження клітин і позаклітинних компонентів артеріальної стінки, проте механізми такого ушкодження до сьогодні залишаються нез'ясованими [15].

Враховуючи важливе значення оксидативного стресу у розвитку судинних уражень різного походження, можна припустити, що цей механізм причетний і до процесів, які лежать в основі менкебергівського склерозу у хворих на ЦД. Для перевірки такого припущення слід спочатку дати відповідь на питання, чи відбувається активація вільнорадикальних реакцій у судинах тварин з експериментальним ЦД, а якщо так, то з чим це пов'язане – з посилен-

ним утворенням первинних вільних радикалів (зокрема, активних форм кисню і азоту) чи з порушенням діяльності антиоксидантних систем. З'ясуванню цього питання присвячено дане дослідження, мета якого визначити інтенсивність процесів ПОЛ і антиоксидантну ферментну активність у кровоносних судинах кролів у динаміці індукованого алоксаном ЦД.

Матеріал і методи. Досліди виконано на 24 кролях-самцях масою 2,0–2,2 кг віком 6 міс. Тварин було поділено на чотири групи по 6 шт. у кожній: одну контрольну і три дослідні. ЦД відтворювали одноразовим внутрішньовенним введенням тваринам алоксану (SIGMA Aldrich) з розрахунку 100 мг на 1 кг маси. Алоксан вводили в ізотонічному розчині NaCl (загальний об'єм розчину 5 мл) у крайову вену вуха кролів, яких позбавили їжі протягом 18 год. Контрольним тваринам внутрішньовенно вводили таку ж саму кількість ізотонічного розчину NaCl. Тварин забивали, використовуючи повітряну емболію через 3 (2-га група), 7 (3-тя) і 14 (4-та) днів після ін'єкції алоксану. Одразу після забою виділяли грудну і черевну аорту, легеневу артерію, задню порожнисту вену. У нефракціонованих гомогенатах судин визначали вміст продуктів ПОЛ (гідропероксидів ліпідів – ГПЛ, шиффових основ – ШО) і антиоксидантну ферментну активність (глутатіонпероксидазну, супероксиддисмтазну, каталазну). Ліпіди з гомогенатів кровоносних судин виділяли і визначали за методом J. Folch et al. [16]. Ліпіди з гомогенатів тканин екстрагували хлороформ-метаноловою сумішшю (2:1, 10 хв, 4 °C). Вміст ГПЛ визначали за ультрафіолетовим спектром поглинання [17], вміст ШО – за спект-

рами флюоресценції [18]. Активність глутатіонпероксидази визначали за кількістю відновленого глутатіону в реакції з перекисом водню з використанням дитіонітробензойної кислоти [19], супероксиддисмутази активність – методом відновлення *p*-нітротетразолію хлориду [20], каталазу активність – використовуючи реакцію молібдату амонію з перекисом водню [21]. Вміст білка в гомогенатах визначали за методом Lowry [22]. Контроль концентрації глюкози в крові здійснювали перед початком експерименту, через 3, 7 і 14 діб за допомогою експрес-аналізатора «GLUCOCARD».

Увесь цифровий матеріал був статистично опрацьований [23].

Результати дослідження. Одноразове введення кролям алоксану супроводжується значним підвищенням концентрації глюкози в крові, що відображає розвиток у тварин ЦД. Так, рівень базальної глікемії у них становив (у ммоль/л): через 3 доби – $22,3 \pm 0,71$; через 7 діб – $19,8 \pm 0,79$; через 14 діб – $17,4 \pm 0,59$ проти $4,6 \pm 0,12$ до індукції діабету. Максимальний рівень гіперглікемії відзначали через 3 доби після введення алоксану, що є характерним для даної моделі ЦД [24].

Визначення вмісту проміжних (ГПЛ) і кінцевих (ШО) продуктів ПОЛ у стінках судин показало, що вже через 3 доби після введення алоксану має місце статистично достовірне збільшення ГПЛ у тканинах легеневої

артерії і задньої порожнистої вени (відповідно на 21,8 і 36,5 %), а через 7 і 14 днів – у всіх вивчених судинах (табл. 1). Водночас статистично достовірне зростання вмісту ШО в артеріях і венах кролів з діабетом спостерігали тільки на 14-й день експерименту, причому рівень збільшення цього показника був набагато меншим, ніж рівень ГПЛ.

Накопичення у стінках кровоносних судин ГПЛ і ШО свідчить про активацію реакцій ПОЛ. В основі цього можуть лежати два механізми: посилене утворення вільних радикалів і недостатність антиоксидантних систем судинної стінки.

Відомо, що в антиоксидантному захисті кровоносних судин провідну роль відіграють ферменти: глутатіонпероксидаза (ГП), супероксиддисмутаза (СОД) і каталаза. Результати дослідження їхньої активності у стінках артерій і вен наведено в табл. 2.

З вивчених антиоксидантних ферментів найчутливішою до дії алоксану виявилася ГП, активність якої істотно знижувалася в легеневій артерії (на 16 %) і задній порожнистій вені (на 21 %) вже через 3 дні після введення алоксану. Через 7 і 14 днів активність ГП зменшувалася в усіх судинах: грудній аорті (відповідно на 22 і 44 %), черевній аорті (на 27,5 і 44 %), легеневій артерії (на 31 і 56 %), задній порожнистій вені (на 42 і 72 %). Значно менших змін зазнавала активність СОД у стінках судин діабетич-

Таблиця 1. Вміст гідропероксидів ліпідів (ГПЛ, нмоль/мг) і шиффових основ (ШО, відн. од./мг) у стінках кровоносних судин кролів за умов розвитку алоксанового діабету ($M \pm t$, $n=6$ у кожній групі)

Кровоносні судини	Групи			
	1-ша (контроль)	2-га	3-тя	4-та
Грудна аорта				
ГПЛ	$18,4 \pm 0,62$	$20,3 \pm 0,88$	$24,9 \pm 1,04^{\wedge}$	$33,6 \pm 2,19^{\wedge}$
ШО	$5,48 \pm 0,54$	$5,93 \pm 0,91$	$7,05 \pm 0,86$	$8,78 \pm 0,79^{\#}$
Черевна аорта				
ГПЛ	$18,0 \pm 0,58$	$20,3 \pm 0,88$	$24,9 \pm 1,0^{\wedge}$	$34,0 \pm 2,4^{\wedge}$
ШО	$5,26 \pm 0,62$	$5,76 \pm 0,93$	$6,86 \pm 0,87$	$8,87 \pm 0,77^{\#}$
Легенева артерія				
ГПЛ	$16,5 \pm 0,80$	$20,1 \pm 1,06^*$	$24,2 \pm 0,91^{\wedge}$	$33,4 \pm 2,68^{\wedge}$
ШО	$4,12 \pm 0,76$	$4,71 \pm 0,62$	$5,64 \pm 1,11$	$7,56 \pm 0,73^{\#}$
Задня порожниста вена				
ГПЛ	$10,4 \pm 0,89$	$14,2 \pm 1,03^*$	$20,0 \pm 1,38^{\wedge}$	$27,1 \pm 2,91^{\wedge}$
ШО	$2,94 \pm 0,52$	$3,53 \pm 0,68$	$4,79 \pm 1,10$	$6,18 \pm 0,95^*$

Примітка. * $p < 0,05$; # $p < 0,01$; \wedge $p < 0,001$ порівняно з контролем. Тут і в табл. 2.

Таблиця 2. Активність антиоксидантних ферментів глутатіонпероксидази (ГП, $\mu\text{кмоль}\cdot\text{хв}^{-1}\cdot\text{мг}^{-1}$ білка), супероксиддисмутази (СОД) і каталази (ум. од./мг білка) у стінках кровоносних судин кролів в умовах розвитку алоксанового діабету ($M\pm m$, $n=6$ у кожній групі)

Кровоносні судини	Групи			
	1-ша (контроль)	2-га	3-тя	4-та
Грудна аорта				
ГП	13,50±0,61	11,90±0,63	10,50±0,68 [#]	7,50±0,69 [^]
СОД	5,92±0,46	5,57±0,54	5,29±0,49	4,76±0,42
каталаза	0,280±0,027	0,260±0,049	0,250±0,046	0,240±0,049
Черевна аорта				
ГП	14,20±0,61	12,80±0,72	10,30±0,65 [#]	8,00±0,76 [^]
СОД	5,98±0,41	5,66±0,52	5,25±0,46	4,65±0,39*
каталаза	0,300±0,034	0,280±0,049	0,270±0,046	0,260±0,045
Легенева артерія				
ГП	16,30±0,83	13,70±0,64*	11,30±0,67 [^]	7,10±0,55 [^]
СОД	6,32±0,44	5,76±0,54	5,44±0,47	4,76±0,42*
каталаза	0,360±0,035	0,340±0,039	0,330±0,045	0,300±0,038
Задня порожниста вена				
ГП	21,1±1,0	16,70±0,97*	12,3±0,7 [^]	5,90±0,79 [^]
СОД	10,20±0,49	9,38±0,76	8,49±0,82	6,93±0,47 [#]
каталаза	0,740±0,054	0,690±0,082	0,660±0,06	0,620±0,082

них тварин. Так, статистично достовірні відхилення цього показника від контрольних величин виявляли тільки через 14 днів експерименту і то не у всіх судинах: у черевній аорті активність СОД зменшувалася на 22 %, у легеневій артерії – на 25 %, у задній порожнистій вені – на 32 %, у грудній аорті даний показник залишався без істотних змін. Третій фермент – каталаза виявилася найстійкішою в умовах алоксанового діабету: протягом усього строку експерименту його активність була сталою як в артеріальній, так і венозній стінці.

Отже, одержані результати свідчать про те, що в умовах розвитку алоксанового діабету у кролів відбувається активація ПОЛ у тканинах кровоносних судин, одним з механізмів якої може бути зменшення активності основних антиоксидантних ферментів – ГП і СОД.

Обговорення результатів. У механізмах розвитку діабетичних макроангіопатій важливе місце посідають розлади метаболічних процесів у стінках кровоносних судин, зокрема порушення їхнього енергопостачання [15]. Отримані нами раніше [25] і на-

ведені у цій роботі дані дають підстави стверджувати, що в умовах експериментального алоксанового діабету відбувається погіршення процесів енергетичного обміну в судинах з одночасною активацією вільнорадикальних реакцій.

Можливим є існування двох варіантів причинно-наслідкових зв'язків між цими явищами. Перший варіант: у разі первинного пригнічення метаболізму судинної стінки, з одного боку, посилюється утворення активних форм кисню в мітохондріях, з іншого – порушується регенерація неферментних антиоксидантів (токоферолу, глутатіону тощо) і синтез антиоксидантних ферментів, що й зумовлює в кінцевому підсумку вторинну активацію ПОЛ. Другий варіант: якщо активація ПОЛ виникає первинно, то розвиваються вторинні порушення енергетичного обміну як наслідок пероксидного ушкодження клітин і їхніх структур (зокрема мітохондрій).

Одержані нами дані про поєднані в часі зміни енергопостачання судин і активацію ПОЛ не дають можливості відповісти на питання: який з наведених варіантів патогене-

тичних зв'язків є провідним. Цілком імовірно, що на певному етапі розвитку діабету таке питання втрачає сенс через існування «зацарованого» патогенетичного кола (circulus vitiosus): порушення енергетичного обміну → активація ПОЛ → порушення енергетичного обміну і т. д.

Незалежно від того, який характер – первинний чи вторинний – має активація ПОЛ, наслідком цього явища є ушкодження клітин і позаклітинних структур судинної стінки. Це, у свою чергу, може стати передумовою процесів, що складають сутність артеріосклерозу Менкеберга: медіанекрозу, медіакальцинозу і медіасклерозу.

Література

1. Davi G. Lipid peroxidation in diabetes mellitus / G. Davi, A. Falco, C. Patrono // *Antioxid. Redox Signal.* – 2005. – V. 7. – P. 256–268.
2. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes / J.L. Evans, I.D. Goldfine, B.A. Maddux, G.M. Grodsky // *Endocr. Rev.* – 2002. – V. 23. – P. 599–622.
3. Maritim A.C. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review / A.C. Maritim, R.A. Sanders, J.B. Watkins // *J. Biochem. Mol. Toxicol.* – 2003. – V. 17. – P. 24–38.
4. Mrowicka M. Free-radical reactions in diabetes mellitus / M. Mrowicka // *Pol. Merkur. Lekarski.* – 2005. – V. 19. – P. 571–576.
5. Heistad D.D. Oxidative stress and vascular disease: 2005 Duff Lecture / D.D. Heistad // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2006. – V. 26. – P. 689–695.
6. Jain S.K. Oxidative stress and metabolic diseases: Introduction / S.K. Jain // *Pathophysiology.* – 2006. – V. 13. – P. 127–128.
7. Ceriello A. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited / A. Ceriello, E. Motz // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – V. 24. – P. 816–823.
8. Mezzetti A. Oxidative stress and cardiovascular complications in diabetes: isoprostanes as new markers on an old paradigm / A. Mezzetti, F. Cipollone, F. Cuccurullo // *Cardiovasc. Res.* – 2000. – V. 47. – P. 475–488.
9. Jakus V. The role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systems in diabetic vascular disease / V. Jakus // *Bratisl. Lek. Listy.* – 2000. – V. 101. – P. 541–551.
10. Schwartz E.A. Molecular and signaling mechanisms of atherosclerosis in insulin resistance / E.A. Schwartz, P.D. Reaven // *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* – 2006. – V. 35. – P. 525–549.
11. Edmonds M.E. Medial arterial calcification and diabetes mellitus / M.E. Edmonds // *Z. Kardiolog.* – 2000. – V. 89. – P. 101–104.
12. Medial arterial calcification and its association with mortality and complications of diabetes / J.E. Everhart, D.J. Pettitt, W.C. Knowler et al. // *Diabetologia.* – 1988. – V. 31. – P. 16–23.
13. 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.
14. Arterial calcification in diabetics / U. Fuchs, P. Caffier, H.G. Schulz, P. Wieniecki // *Virch. Arch.* – 1985. – V. 407. – P. 431–439.
15. Быць Ю.В. Сравнительно-патологические аспекты энергообеспечения сосудистой стенки / Ю.В. Быць, В.П. Пишак, А.В. Атаман. – К. – Черновцы: Прут, 1999. – 330 с.
16. Folch J. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues / J. Folch, M. Lees, G.H.S. Stanley // *J. Biol. Chem.* – 1957. – V. 226. – P. 497–509.
17. Гаврилов В.В. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В.В. Гаврилов, М.И. Мишкорудная // *Лаб. дело.* – 1983. – № 3. – С. 33–36.
18. Колесов О.Е. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах / О.Е. Колесов, А.А. Маркин, Т.Н. Федорова // *Лаб. дело.* – 1984. – № 9. – С. 540–546.
19. Кругликова Г.А. Глутатионпероксидазная и глутатионредуктазная активность печени крыс после введения селенита натрия / Г.А. Кругликова, Ц.М. Штутман // *Укр. биохим. журн.* – 1975. – Т. 48, № 2. – С. 223–228.

Висновки

1. Розвиток експериментального алоксанового діабету супроводжується накопиченням у стінках артеріальних і венозних судин проміжних (гідропероксиди ліпідів) і кінцевих (шиффові основи) продуктів ПОЛ.

2. Для алоксанового діабету у кролів характерно зменшення активності антиоксидантних ферментів судинної стінки – глутатионпероксидази і супероксиддисмутази.

3. Активація ПОЛ у кровоносних судинах тварин з цукровим діабетом може бути патогенетичним механізмом розвитку одного з різновидів діабетичних макроангіопатій – артеріосклерозу Менкеберга.

20. Суплютов С.Н. Суточные и сезонные ритмы перекисей липидов и активности супероксиддисмутазы в эритроцитах у жителей средних широт и крайнего севера / С.Н. Суплютов, Э.Н. Буркова // Лаб. дело. – 1986. – № 8. – С. 459–462.
21. Метод определения активности каталазы / М.А. Королук, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, Е.В. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – № 6. – С. 16–18.
22. Protein measurement with the folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 93. – P. 265–275.
23. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
24. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes / S. Lenzen // Diabetologia. – 2008. – V. 51. – P. 216–226.
25. Атаман Ю.О. Вплив алоксанового цукрового діабету на вміст вільних аденінових нуклеотидів у стінках артерій і вен кролів / Ю.О. Атаман // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2008. – № 2. – С. 15–17.

ИНТЕНСИВНОСТЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И АНТИОКСИДАНТНАЯ ФЕРМЕНТНАЯ АКТИВНОСТЬ В СТЕНКАХ АРТЕРИЙ И ВЕН КРОЛИКОВ С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ

Ю.А. Атаман

Показано, что развитие аллоксанового диабета у кроликов сопровождается увеличением содержания продуктов перекисного окисления липидов (гидроперекисей липидов, шиффовых оснований) в стенках артериальных и венозных сосудов. Одновременно отмечается уменьшение активности антиоксидантных ферментов (глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы) в тканях изученных кровеносных сосудов.

Ключевые слова: аллоксановый диабет, перекисное окисление липидов, артерии, вены.

INTENSITY OF LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDATIC ENZYME ACTIVITY IN ARTERIAL AND VENOUS WALLS OF RABBITS WITH ALLOXAN DIABETES

Yu.O. Ataman

In the work it is shown that development of alloxan diabetes in rabbits is accompanied by augmentation of lipid peroxidation products (hydroperoxides of lipids, Schiff's bases) in walls of arteries and veins. Simultaneously it is revealed the reduction of activity of antioxidative enzymes (glutathione peroxidase, superoxide dismutase) in tissues of the studied blood vessels.

Key words: alloxan diabetes, lipid peroxidation, arteries, veins.

Поступила 21.12.09