

Регуляция K_{ATP} - и $ВК_{Ca}$ -каналов коронарных сосудов, зависящая от iNOS, в условиях сахарного диабета

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет
210023, Республика Беларусь, Витебск, пр. Фрунзе, 27
e-mail: lazuko71@mail.ru

Реферат

Введение. Нарушение регуляции сосудистого тонуса при сахарном диабете является важным патогенетическим механизмом диабетических макро- и микроангиопатий. Понимание тонких механизмов нарушений регуляции тонуса коронарных артерий при экспериментальном сахарном диабете будет способствовать разработке новых подходов, способных, в конечном итоге, привести к снижению смертности пациентов с сахарным диабетом от сердечно-сосудистых катастроф. **Цель работы.** Оценить вклад оксида азота, образуемого индуцибельной NO-синтазой, в механизмы регуляции K_{ATP} - и $ВК_{Ca}$ -каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов крыс при стрептозоцин-индуцированном сахарном диабете.

Материал и методы исследования. Сахарный диабет у крыс-самок моделировали с помощью однократного внутрибрюшинного введения стрептозоцина (50 мг/кг). Тонус коронарных сосудов и сократительную функцию миокарда исследовали на препаратах сердец крыс, изолированных по методу Лангендорфа. Блокаду iNOS осуществляли S-метилизотиомочевинной (S-MT, 10^{-6} М); K_{ATP} - и $ВК_{Ca}$ -каналов – глибенкламидом (10 мкМ) и тетраэтиламмонием (1 мМ), соответственно. Экспрессию iNOS и eNOS в миокарде определяли иммуногистохимическим методом; NO-синтазную активность, концентрацию стабильных продуктов деградации NO (NO^2/NO^3) – спектрофотометрическим; концентрацию iNOS и eNOS, ИЛ-1 β – методом твердофазного иммуноферментного анализа; концентрацию С-реактивного белка – иммунотурбидиметрическим методом.

Результаты исследования и их обсуждение. У животных с экспериментальным сахарным диабетом снижается тонус коронарных сосудов и сократительная функция миокарда. Уменьшается чувствительность гладкомышечных клеток коронарных сосудов к блокаторам глибенкламиду и тетраэтиламмонии. Данные нарушения происходят на фоне повышенного образования ИЛ-1 β , усиления образования продуктов перекисного окисления липидов, повышения экспрессии и активности iNOS. Окисление и/или, нитрозилирование сульфгидрильных групп редокс-сенсоров в составе белковых молекул K_{ATP} - и $ВК_{Ca}$ -каналов в этих условиях могут быть одним из патогенетических механизмов развития каналопатии.

Выводы. У крыс с сахарным диабетом существенно нарушается функциональная активность K_{ATP} - и $ВК_{Ca}$ -каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов в условиях повышения активности iNOS.

Ключевые слова: стрептозоцин-индуцированный сахарный диабет, тонус сосудов, индуцибельная NO-синтаза, K_{ATP} -каналы, $ВК_{Ca}$ -каналы.

Введение

Стойкая гипергликемия, развивающаяся у пациентов с сахарным диабетом, является пусковым механизмом развития осложнений сахарного диабета, приводящих к ухудшению качества жизни пациентов, снижению их трудоспособности и укорочению продолжительности жизни. Патогенез диабетических макро- и микроангиопатий, подходы к их профилактике и способы лечения в настоящее время активно изучаются. Установлено, что одним из важнейших патогенетических механизмов этих осложнений является дисфункция эндотелиоцитов кровеносных сосудов [7]. В частности, она характеризуется снижением экспрессии гена эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) и уменьшением активности этой изоформы фермента при повышении активности индуцибельной NO-синтазы (iNOS) во многих типах клеток, в

т.ч. в кардиомиоцитах [8], сосудистых гладкомышечных клетках [11] и эндотелиоцитах кровеносных сосудов [11].

В последнее десятилетие особый интерес проявляется к изучению роли калиевых каналов в механизмах нарушений функционирования клеток кровеносных сосудов при различной форме патологии [12]. В частности установлено, что при стойкой гипергликемии нарушается функционирование ATP -чувствительных калиевых каналов (K_{ATP} -каналов) и кальцием активируемых калиевых каналов большой проводимости ($ВК_{Ca}$ -каналов) расположенных в эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудистой стенки [9, 10, 13, 14]. При этом не вполне ясно, каким образом гиперпродукция NO, продуцируемого индуцибельной NO-синтазой при стрептозоцин-индуци-

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

рованном сахарном диабете влияет на функциональную активность калиевых каналов гладкомышечных клеток сосудов сердца. Понимание iNOS-зависимых механизмов регуляции тонуса коронарных сосудов при хронической гипергликемии поможет объяснить формирование сосудистых катастроф, наблюдаемых у пациентов с сахарным диабетом.

Цель исследования — оценить вклад оксида азота, образуемого индуцибельной NO-синтазой, в механизмы регуляции K_{ATP} - и $ВК_{Ca}$ -каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов крыс при стрептозоцин-индуцированном сахарном диабете.

Материал и методы исследования

Эксперименты выполнены на беспородных крысах-самках (n=156), распределенных по группам: (1) «контроль»; (2) «сахарный диабет». Эксперименты на животных проводились в соответствии с требованиями Женевской конвенции «International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals» (Geneva, 1990).

Сахарный диабет у крыс моделировали с помощью однократного внутрибрюшинного введения стрептозоцина (50 мг/кг), разведенного в цитратном буфере (pH 4,5). Контрольным крысам однократно внутрибрюшинно вводили равное количество цитратного буфера без стрептозоцина. Поскольку далее не было обнаружено достоверного изменения изучаемых показателей контрольных животных с интактными, которым не вводили цитратный буфер, все сравнения проводили с группой «контроль». Концентрацию глюкозы в крови хвостовой вены определяли при помощи глюкометра Finetest (Корея), мочи — Глюко-Альбу-рН-Уротестом УП «Унитехпром БГУ». Через 14 дней после введения стрептозоцина крыс с уровнем глюкозы в крови выше 20 ммоль/л и глюкозурией брали в эксперимент.

Тонус коронарных сосудов и сократительную функцию миокарда изучали на препаратах сердец крыс, изолированных по Лангендорфу. Сердца перфузировали раствором Кребса-Хензеляйта стандартного состава, насыщенным карбогеном (95 % O_2 и 5 % CO_2), в условиях постоянного потока, при объемной скорости коронарного потока (ОСКП), составлявшей 10 мл/мин. Сердце помещали в установку для перфузии изолированного сердца мелких лабораторных животных ИН-SR типа 844/1 (HSE-НА, ФРГ), оборудованную датчиками для измерения аортального и развиваемого внутрижелудочкового давления (Isotec pressure transducer). Датчики были соединены с модулями для измерения давления ТАМ-А, HSE-НА. Компьютерную регистрацию и обработку измеряемых показателей осуществляли с помощью программы ACAD (HSE, ФРГ). Сердца сокращались в постоянном ритме с частотой 240 в минуту при подаче импульсов от электростимулятора С тип — 224 (HSE-НА, ФРГ). По истечении 15 мин., необходимых для стабилизации работы сердец, регистрировали развиваемое внутрижелудочковое давление (РВД) при помощи латексного баллончика постоянного объема, находящегося в левом желудочке.

Для изучения роли NO, продуцируемого iNOS, в

механизмах регуляции тонуса коронарных сосудов в перфузионный раствор добавляли высокоселективный блокатор iNOS S-метилизотиомочевину (S-MT, 10^{-6} M, Sigma, USA). Для изучения роли K_{ATP} -каналов и $ВК_{Ca}$ -каналов в регуляции тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда в перфузионный раствор добавляли блокатор K_{ATP} -каналов глибенкламид (ГЛБ, который растворяли в DMSO - Dimethyl sulfoxide) в концентрации 10 мкМ, или блокатор $ВК_{Ca}$ -каналов тетраэтиламмоний (ТЭА) в концентрации 1 мМ. Вклад этих каналов в регуляцию тонуса сосудов сердца, определяли по величине вазоконстрикторного эффекта глибенкламида или тетраэтиламмония, соответственно, т.е. по величине прироста коронарного перфузионного давления, выраженного в % от исходного.

NO-синтазную активность определяли в сыворотке крови спектрофотометрическим методом при длине волны 340 нм, по изменению уровня NADPH в среде, состоящей из 0,1 М трис-HCl-буфера pH 7,4, 10 мМ $CaCl_2$ (для определения eNOS), 1 мМ ЭДТА (для определения iNOS), 1 мМ NADPH, 1 мМ L-аргинина. Активность NO-синтаз выражали в нмоль/г белка в минуту. Концентрацию ферментов iNOS и eNOS в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа, используя тест-системы и реагенты для iNOS (Uscn, Life Science Inc. China, Lot L130827587) и для eNOS (Cloud-Clone Corp. USA, Uscn, Life Science Inc., Lot L141013209), с помощью фотометра универсального Ф-300 ТП при $\lambda=450$ нм. Содержание iNOS в сыворотке крови выражали в нг/мл, eNOS в пг/мл.

Концентрацию ИЛ-1 β в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа, используя тест-системы Thermo Scientific, USA, Lot LD145322. Концентрацию ИЛ-1 β в сыворотке крови выражали в пг/мл.

Концентрацию С-реактивного белка в сыворотке крови определяли иммунотурбидиметрическим методом при использовании диагностического набора C-Reactive Protein (CRP), BioSystems (Испания) по инструкции производителя. Содержание С-реактивного белка выражали в мг/л. Концентрацию стабильных продуктов деградации NO (NO^2^- / NO^3^-) определяли в гомогенате левого желудочка спектрофотометрическим методом с использованием реактива Грисса при длине волны 540 нм [2]. Об активации перекисного окисления липидов в миокарде судили по накоплению в нем диеновых конъюгатов и малонового диальдегида [1, 3, 4]. Содержание гликированного гемоглобина определяли методом быстрого разделения на ионообменной смоле, при помощи набора реагентов для определения гликированного гемоглобина «Анализ плюс».

Иммуногистохимия. После фиксации левого желудочка в 10 % растворе нейтрального забуференного формалина и стандартной гистологической проводки готовили серийные срезы миокарда толщиной 5–7 мкм. Для гистологического исследования использовали следующие методы окраски: гематоксилином и эозином, иммуногистохимическую с использованием поликлональных антител к iNOS (1:75) и

эндотелиальной NOS (eNOS) (1:150) (Abcam, UK). В качестве визуализирующей системы использовали Bond Polymer Refine Detection (Leica, UK), включающую комплекс вторичных антител и диаминобензин (ДАБ) в качестве хромогена и гематоксилин для окрашивания препаратов. Иммуногистохимическое окрашивание препаратов проводили с использованием роботизированной станции по иммуногистохимическому окрашиванию препаратов BondTM – MAX Processing Module (производства Biosystems Melbourne Pty Ltd, Австралия) в соответствии с протоколами окрашивания и рекомендациями Leica. После автоматизированного окрашивания препараты промывали под проточной водой, обезживали в спирте и просветляли в карбол–ксилоле и ксилоле. После этого срезы заключали в среду «Biomount» (производитель) и накрывали покровным стеклом.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью стандартного пакета статистических программ «STATISTICA 10.0» и «MS Excel». Величины количественных показателей в экспериментальных группах представляли в виде медианы (Me), интерквартильного интервала [25 %; 75 %]. О достоверности различий между несвязанными

выборками судили по критерию Манна–Уитни (U) и Уилкоксона (W). Проверку статистических гипотез выполняли при критическом уровне значимости 5 % ($p < 0,05$).

Результаты исследования

В группе животных с экспериментальным сахарным диабетом уровень глюкозы в крови составил $26,1 \pm 1,7$ ммоль/л, что было в 5 раз выше, чем у контрольных крыс ($5,7 \pm 1,1$ ммоль/л, $p < 0,05$). В группе «сахарный диабет» выявлялись глюкозурия и кетонурия. В группе животных с экспериментальным сахарным диабетом в течение 14–ти дней выживаемость составляла 70 %. По истечении 14–ти дней после введения стрептозоцина у крыс масса тела снижалась в среднем на 19 % и составляла $148 \pm 3,1$ грамм против $183 \pm 6,3$ грамм до начала эксперимента. Стрептозоцин–индуцированный сахарный диабет приводил к повышению содержания гликированного гемоглобина до 5,4 % ($p < 0,05$, для сравнения в контроле 2,6 %). Эти данные свидетельствуют об адекватности выбранной нами модели и косвенно подтверждают выраженный дефицит инсулина после введения стрептозоцина.

Влияние глибенкламида и S-метилизотиомочевина на изменение коронарного перфузионного давления при экспериментальном сахарном диабете

Таблица 1

Группы экспериментальных животных	Показатель	Условия перфузии миокарда. КПД, мм рт. ст., при ОСКП 10 мл/мин.			
		Без блокатора (n=8)	С S-метилизотиомочевинной (n=10)	С глибенкламидом (n=8)	С глибенкламидом и S-метилизотиомочевинной (n=10)
Контроль	Медиана, %	81,00	90,00	157,50	160,50
	Размах (Min–Max), %	60,00–95,00	63,00–100,00	125,00–167,00	115,00–184,00
	95% ДИ для медианы, %	71,60–90,40	79,70–100,30	144,20–170,80	144,37–176,30
	25–75 процентиль, %	72,50–85,50	76,30–100,00	137,50–161,30	142,75–176,50
	p			$p_2 < 0,0009$	$P_2 < 0,0009$
Сахарный диабет	Показатель	Без блокатора (n=8)	С S-метилизотиомочевинной (n=8)	С глибенкламидом (n=8)	С глибенкламидом и S-метилизотиомочевинной (n=8)
	Медиана, %	55,50	84,00	96,50	155,00
	Размах (Min–Max), %	50,00–64,00	74,00–96,00	77,00–100,0	145,00–165,00
	95% ДИ для медианы, %	51,86–59,14	77,90–90,10	89,45–103,55	149,34–161,66
	25–75 процентиль, %	54,75–58,25	78,5–88,25	90,75–98,00	151,75–161,50
	p	$P_1 < 0,0019$	$P_2 < 0,0009$	$P_1 < 0,0009$; $p_2 < 0,0009$	$P_2 < 0,0009$

Примечание: p_1 – по сравнению с контрольной группой животных; p_2 – по сравнению с той же группой, но без блокатора. n – количество животных в группе. КПД – коронарное перфузионное давление; ОСКП – объемная скорость коронарного потока.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

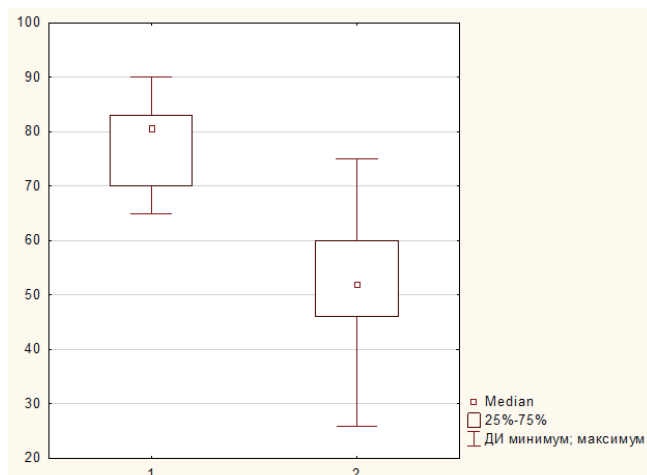


Рис. 1. Влияние экспериментального сахарного диабета на величину развиваемого внутрижелудочкового давления. По оси абсцисс: 1 — контроль; 2 — сахарный диабет; по оси ординат — величина развиваемого внутрижелудочкового давления в мм рт. ст.; [25%-75%] — интерквартильный интервал, ДИ — доверительный интервал. * — $p < 0,0027$, по сравнению с контрольной группой

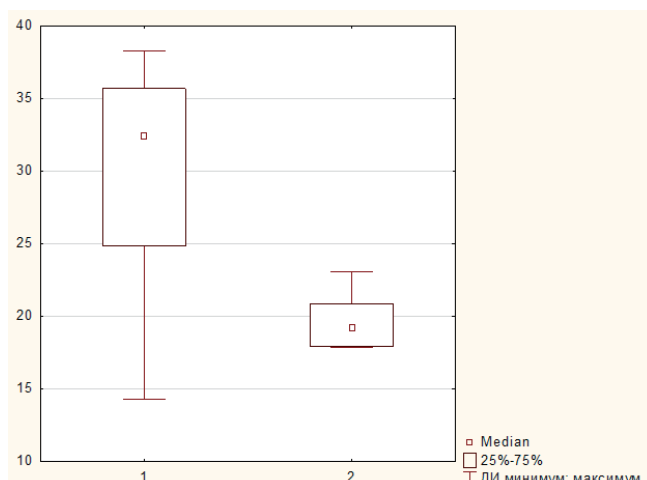


Рис. 2. Влияние глибенкламида на изменение величины развиваемого внутрижелудочкового давления при экспериментальном сахарном диабете. По оси абсцисс: 1 — контроль+глибенкламид; 2 — сахарный диабет+глибенкламид; по оси ординат — изменение величины развиваемого внутрижелудочкового давления, выраженное в %; [25%-75%] — интерквартильный интервал, ДИ — доверительный интервал. * — $p < 0,031$, по сравнению с группой контроль+глибенкламид

В сердцах животных группы «сахарный диабет» — коронарное перфузионное давление и развиваемое внутрижелудочковое давление снижались на 23 и 35 %, соответственно (табл. 1, рис. 1). Данный факт свидетельствует о снижении тонуса коронарных сосудов и сократительной функции миокарда у крыс с экспериментальным сахарным диабетом. Добавление в перфузионный раствор блокатора iNOS при перфузии сердца животных группы «сахарный диабет» приводило к восстановлению тонуса коронарных сосудов и сократительной функции сердца до контрольных значений. Таким образом, высокие концентрации NO, образуемого iNOS при экспериментальном сахарном диабете, имеют важное значение в механизмах

ослабления тонуса коронарных сосудов и снижения сократительной функции миокарда.

Введение ГЛБ в коронарное русло изолированного сердца крыс с сахарным диабетом сопровождалось увеличением коронарного перфузионного давления на 64 %, т.е. в этой группе коронарореконстрикторный эффект ГЛБ был на 28 % меньше, чем в контроле (табл. 1). РВД при этом снижалось на 18 % (для сравнения, снижение РВД в контроле составило 29 %, рис. 2). Следовательно, сахарный диабет снижал эффективность действия ГЛБ в отношении величины коронарного перфузионного давления и сократительной функции миокарда, что может быть обусловлено снижением функциональной активности K_{ATP} -каналов, как гладкомышечных, так и эндотелиальных клеток. В изолированных сердцах крыс группы «сахарный диабет» на фоне блокады синтеза NO (с помощью S-MT) интракоронарное введение ГЛБ увеличивало коронарное перфузионное давление на 86 % и снижало развиваемое внутрижелудочковое давление на 28 %, что было сопоставимо с контрольными показателями при совместной блокаде iNOS и K_{ATP} -каналов (табл. 1).

Введение ТЭА в коронарное русло изолированного сердца крыс с сахарным диабетом сопровождалось увеличением коронарного перфузионного давления на 66 %, что было на 30 % меньше, чем выраженность коронарореконстрикторного эффекта ТЭА в контроле (табл. 1), а РВД при этом не изменялось. Следовательно, сахарный диабет снижал эффективность действия ТЭА в отношении величины коронарного перфузионного давления, что может быть обусловлено снижением функциональной активности BK_{Ca} -каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов. В изолированных сердцах крыс группы «сахарный диабет» на фоне блокады синтеза NO (с помощью S-MT) интракоронарное введение ТЭА увеличивало коронарное перфузионное давление на 84 %, что было сопоставимо с контрольными показателями при совместной блокаде iNOS и BK_{Ca} -каналов (табл. 1).

Таким образом, хроническая гипергликемия у крыс с сахарным диабетом существенно подавляет функциональную активность как K_{ATP} -каналов, так и BK_{Ca} -каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов и создает выраженную зависимость их активности от функционирования iNOS.

Концентрация NO^{2-}/NO^{3-} в миокарде крыс группы «сахарный диабет» достоверно увеличивалась на 97 %, по сравнению с контрольным значением (табл. 2).

Активность iNOS в сыворотке крови животных с экспериментальным сахарным диабетом увеличивалась в 3,8 раза, при этом активность eNOS не отличалась от контрольных показателей. Методом ИФА установлено, что в группе животных «сахарный диабет», концентрация eNOS в сыворотке крови не изменялась, а индуцибельной — возрастала в 5 раз, по сравнению с контрольными показателями.

При иммуногистохимическом исследовании препаратов сердца контрольной группы животных изоформа eNOS определялась в цитоплазме кардиомиоцитов и эндотелии коронарных сосудов от умеренной (++) до выраженной (+++). Реакция iNOS

Влияние тетраэтиламмония и S-метилизотиомочевина на изменение коронарного перфузионного давления при экспериментальном сахарном диабете

Таблица 2

Группы экспериментальных животных	Показатель	Условия перфузии миокарда. КПД, мм рт.ст., при ОСКП 10 мл/мин.			
		Без блокатора (n=8)	С S-метилизотиомочевинной (n=8)	С тетраэтиламмонием (n=8)	С тетраэтиламмонием и S-метилизотиомочевинной (n=8)
Контроль	Медиана, %	81,00	87,00	160,00	173,00
	Размах (Min–Max), %	75,00–95,00	75,00–100,00	140,00–179,00	139,00–181,00
	95% ДИ для медианы, %	75,30–86,30	79,63–94,37	151,00–169,00	158,60–187,40
	25–75 процентиль, %	77,50–85,00	81,50–95,80	155,80–165,00	147,30–177,50
	p			$p_2 < 0,0005$	$P_2 < 0,0009$
Сахарный диабет	Показатель	Без блокатора (n=8)	С S-метилизотиомочевинной (n=7)	С тетраэтиламмонием (n=8)	С тетраэтиламмонием и S-метилизотиомочевинной (n=7)
	Медиана, %	62,00	90,00	102,00	169,00
	Размах (Min–Max), %	33,00–67,00	70,00–109,00	57,00–110,00	140,00–185,00
	95% ДИ для медианы, %	52,40–71,6	76,00–103,00	86,30–117,80	153,60–184,40
	25–75 процентиль, %	55,80–65,00	78,00–103,00	90,00–108,00	151,00–176,00
	p	$P_1 < 0,009$	$P_2 < 0,0014$	$P_1 < 0,0009$; $p_2 < 0,0073$	$P_2 < 0,0009$

Примечание: p_1 — по сравнению с контрольной группой животных; p_2 — по сравнению с той же группой, но без блокатора. n — количество животных в группе. КПД — коронарное перфузионное давление; ОСКП — объемная скорость коронарного потока.

была слабой (+), преимущественно в цитоплазме кардиомиоцитов. При экспериментальном сахарном диабете реакция eNOS была слабой «+» окрашивание наблюдалось преимущественно в цитоплазме кардиомиоцитов. Реакция iNOS была умеренно-выраженная (++), преимущественно в кардиомиоцитах и во всех оболочках сосудов.

В сыворотке крови крыс группы «сахарный диабет» концентрация С-реактивного белка увеличивалась в 2 раза, по сравнению с контрольными значениями. Концентрация ИЛ-1 β в сыворотке животных с сахарным диабетом была увеличена в 5 раз, по сравнению с группой «контроль» (табл. 3). Содержание диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в миокарде животных группы «сахарный диабет» также достоверно возрастало, по сравнению с контрольными показателями (табл. 3).

Обсуждение результатов

Снижение функциональной активности K_{ATP} - и $ВК_{Ca}$ -каналов при экспериментальном сахарном диабете в значительной мере были обусловлены гиперпродукцией оксида азота, продуцируемого индуцибельной NO-синтазой. В пользу этого вывода свидетельствуют, во-первых: увеличение коронаро-

констрикторного действия блокаторов ТЭА и ГЛБ при перфузии сердец животных с экспериментальным сахарным диабетом, раствором, содержащим высокоселективный блокатор iNOS; во вторых – 5-кратное увеличение концентрации в сыворотке крови этих крыс iNOS, а также умеренное накопление этого фермента в гладкомышечных и эндотелиальных клетках коронарных сосудов, наблюдаемым при иммуногистохимическом исследовании; в-третьих, системное увеличение активности фермента iNOS при неизменной активности eNOS, наряду с достоверным повышением содержания в крови стабильных продуктов деградации оксида азота — нитратов/нитритов. Обнаружение двукратного увеличения содержания С-реактивного белка и пятикратное ИЛ-1 β в крови крыс с экспериментальным сахарным диабетом отражает не только развитие в этих условиях системного воспаления низкой интенсивности, но и объясняет один из механизмов активации iNOS в этих условиях.

Выявленное нами и другими исследователями [5] системное воспаление низкой интенсивности, развивающееся при хронической гипергликемии, объясняет частое возникновение при этом сосудистых «катастроф», важнейшим звеном патогенеза

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние экспериментального сахарного диабета на концентрацию $\text{NO}^{2-}/\text{NO}^{3-}$, продуктов перекисного окисления липидов в миокарде и С-реактивного белка, интерлейкин 1 β в сыворотке крови экспериментальных животных

Таблица 3

Группа	Показатель	$\text{NO}^{2-}/\text{NO}^{3-}$, мкМ	С-реактивный белок, мг/л	Интерлейкин 1 β , пкг/л	ДК, нмоль/г липидов	МДА, нмоль/г белка
Контроль (n=19)	Медиана, %	24,2	0,21	6,42	117,57	61,84
	Размах (Min-Max), %	18,0–31,10	0,06–0,25	0,18–12,67	18,04–129,68	25,86–177,32
	95% ДИ для медианы, %	21,11–27,29	0,13–0,29	2,47–6,01	93,26–141,88	41,32–82,36
	25;75 процентиль, %	21,60;26,70	0,07;0,23	3,34;7,99	103,05; 127,53	51,52; 82,80
Сахарный диабет (n=17)	Медиана, %	43,00 p<0,006	0,34 p<0,020	31,23 p<0,0007	199,00 p<0,0004	129,01 p<0,0024
	Размах (Min-Max), %	33,06–66,81	0,13–0,53	20,24–55,57	172,46–397,29	90,24–612,84
	95% ДИ для медианы, %	37,96–48,43	0,24–0,44	19,10–43,37	129,18–268,82	41,69–299,71
	25;75 процентиль, %	39,31;54,94	0,25;0,37	2,36;5,13	180,30; 274,75	118,24; 258,26

Примечание: p — по сравнению с контрольной группой; n — количество животных в группе.

которых является плохо контролируемое воспаление в сосудистой стенке.

Рассуждая таким образом, можно предположить, что последовательность событий, приводящих к уменьшению функциональной активности K_{ATF} - и BK_{Ca} -каналов после экспериментального сахарного диабета, может быть следующей: выраженный дефицит инсулина стойкие метаболические расстройства развитие окислительного стресса повреждение различных клеток воспаление с образованием провоспалительных цитокинов (интерлейкина-1 β и фактора некроза опухоли- α), активация ядерного фактора транскрипции NF- κ B и образование большого количества iNOS в клетках коронарных сосудов и миокарда [6]. Пероксинитрит, образующийся при взаимодействии NO с супероксидным радикалом, наряду с другими активными формами кислорода могут окислять и/или, нитрозировать сульфгидрильные группы в составе белковых молекул K_{ATF} - и BK_{Ca} -каналов, с последующим снижением функциональной активности этих каналов [14, 15].

Таким образом, установлено, что снижение функциональной активности K_{ATF} - и BK_{Ca} -каналов гладкомышечных клеток коронарных сосудов при стрептозоцин-индуцированном сахарном диабете в значительной мере обусловлено стимуляцией индуцибельной NO-синтазы, которая в этих условиях может продуцировать не только оксид азота, но и активные формы кислорода. Полученные результаты свидетельствуют о существенном изменении фенотипических характеристик клеток сердца и его сосудов при экспериментальном стрептозоцин-индуцированном сахарном диабете, что может объяснять специфический характер сосудистых реакций. Дальнейшее изучение механизмов регуляции тонуса кровеносных сосудов будет полезным для разработки новых методов профилактики и лечения сосудистых «катастроф» у пациентов с сахарным диабетом 1-го типа с учетом роли iNOS и калиевых каналов в патогенезе нарушений механизмов регуляции сосудистого тонуса

Литература

1. Андреева Л.И., Кожеев В.А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой. Лабораторное дело. 1989. № 11. С.41-43.
2. Веремей И.С., Солодов А.П. Восстановление $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ цинковой пылью в присутствии аммиачного комплекса сульфата меди // Сборн. научных трудов ВГМУ. Витебск. 1999. С. 274-277.
3. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф. Измерение диеновых конъюгатов в плазме по ультрафиолетовому поглощению гептановых и изопропиловых экстрактов. Лаб. дело. 1988. №2. С.60–64.
4. Стальной М.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового альдегида с помощью тиобарбитуровой

кислоты. Современные методы в биохимии. Под. ред. В.Н.Ореховича. М. Медицина. 1977. С.66–68.

5. Abu-Saleh N., Ovcharenko E., Awad H. et al. Involvement of the endothelin and nitric oxide systems in the pathogenesis of renal ischemic damage in an experimental diabetic model // Life Sci. – 2012. – Vol. 91. № 13-14. P. 669–675.
6. Ahmed S., Mundhe N., Borgohain M. et al. Diosmin Modulates the NF- κ B Signal Transduction Pathways and Downregulation of Various Oxidative Stress Markers in Alloxan-Induced Diabetic Nephropathy // Inflammation. 2016. Vol. 39. № 5. P. 1783-1797. doi: 10.1007/s10753-016-0413-4.
7. Bonnefont-Rousselot D., Beaudoux J., Thérond P. et al. Diabetes mellitus, oxidative stress and endothelial dysfunction

// *Ann Pharm Fr.* 2004. Vol. 62. № 3. P. 147-157.

8. Ceriello A., Quagliaro L., D'Amico M. et al. Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat // *Diabetes*. 2002. Vol. 51. №4. P. 1076-1082.

9. Ko E., Han J., Jung I., Park W. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells // *J. Smooth Muscle Res.* 2008. Vol. 44. № 2. P. 65-81.

10. Liang W., Chen J., Mo L. et al. ATP-sensitive K⁺ channels contribute to the protective effects of exogenous hydrogen sulfide against high glucose-induced injury in H9c2 cardiac cells // *Int J Mol Med.* 2016. Vol. 37. № 3. P. 763-772. doi: 10.3892/ijmm.2016.2467.

11. Nagareddy P., Xia Z., McNeill J., MacLeod K. Increased expression of iNOS is associated with endothelial dysfunction and impaired pressor responsiveness in streptozotocin-induced

diabetes // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005. Vol. 289. № 5. – P. H2144-2152.

12. Nilius B., Droogmans G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium // *Physiol. Rev.* 2001. Vol. 81. № 4. P. 1415-1459.

13. Shieh C., Coghlan M., Sullivan J., Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities // *J. Pharmacol. Rev.* 2000. Vol. 52. № 4. P. 557-594.

14. Ye C., Shen B., Ren X. et al. An increase in opening of BK(Ca) channels in smooth muscle cells in streptozotocin-induced diabetic mice // *Acta Pharmacol. Sin.* 2004. Vol. 25. № 6. P. 744-750.

15. Zeidner G., Sadjia R., Reuveny E. Redox-dependent Gating of G Protein-coupled Inwardly Rectifying K⁺ Channels // *The Journal of Biological Chemistry.* 2001. Vol. 276. № 38. P. 3564-3570.

UDK [612.1:616.379-008.64-092.4]

Lazuko S. S.

iNOS-dependent regulation of K_{ATP}- and BK_{Ca}-channels of coronary vessels in the experimental diabetes mellitus

*Vitebsk State Medical University
Vitebsk, Belarus, pr. Frunze, 27.
e-mail: lazuko71@mail.ru*

Abstract

Introduction and purpose. Disorder of coronary vessels' tone regulation is an important pathogenetic mechanism of diabetic macro- and microangiopathies. Evaluation of delicate mechanisms of such disorders will favour development of new approaches which may decrease patients' mortality rate from cardiovascular catastrophes. The aim of the research is to estimate of the role of nitric oxide produced by inducible NO-synthase in the mechanisms of regulation of the K_{ATP}- and BK_{Ca}-channels of coronary vascular smooth muscle cells in streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats.

Material and methods. Diabetes mellitus was reproduced in female rats with single injection of streptozotocin intraperitoneally (50 mg/kg). Coronary vessels' tone and myocardial contractility were investigated on isolated with Langendorff's method hearts. Activity of iNOS was blocked with S-methylisothiourea (S-MT, 10⁻⁶M); K_{ATP}- and BK_{Ca}-channels – with glybenclamid (10 μM) and tetraethylammonia (1mM), respectively. Expression of iNOS и eNOS in the myocardium was detected with immunohistochemical method; concentration of the stable products of NO degradation (NO²/NO³) was determined spectrophotometrically; concentration of iNOS, eNOS, and IL-1β was detected with enzyme-linked immunosorbent assay; concentration of C-reactive protein was estimated with immunoturbidimetric method.

Results. Experimental diabetes mellitus results in a decrease of coronary vessels' tone and myocardial contractility and a poor sensitivity of vascular smooth muscle cells to the blockers of their ion channels glybenclamid and tetraethylammonia. These changes associate with hyperproduction of IL-1β, increased lipoperoxidation in the blood and enhanced both expression and activity of iNOS. Oxidation and/or nitrozylation of sulphhydryl groups of redox-sensors in the molecules of the K_{ATP}- and BK_{Ca}-channels of the coronary vascular smooth muscle cells during experimental diabetes mellitus may be one from the number of pathogenetic mechanisms of the channelopathy.

Conclusions. The functional activity of the K_{ATP}- and BK_{Ca}-channels of the coronary vascular smooth cells is significantly impaired in parallel with activation of iNOS in rats with experimental diabetes mellitus.

Keywords: streptozotocin-induced diabetes mellitus, vessels' tone, inducible NO-synthase, K_{ATP}-channels, BK_{Ca}-channels.

References

1. Andreeva L.I., Kozhemyakin V.A. Modifikaciya metoda opredeleniya perekisej lipidov v teste s tiobarbiturovoj kisloty. *Laboratornoe delo.* 1989. № 11. S.41-43.

2. Veremej I.S., Solodkov A.P. Vosstanovlenie NO₂-/NO₃- cinkovoj pyl'yu v prisutstvii ammiachnogo kompleksa sul'fata medi // *Sborn. nauchnyh trudov VGMU. Vitebsk.* 1999. S. 274-277.

3. Gavrilov V.B., Gavrilova A.R., Hmara N.F. Izmerenie dienovyh kon'yugatov v plazme po ul'trafioletovomu pogloshcheniyu geptanovyh i izopropil'nyh ehkstraktov. *Lab. delo.* 1988. №2. S.60-64.

4. Stal'noj M.D., Garishvili T.G. Metod opredeleniya

malonovogo al'degida s pomoshch'yu tiobarbiturovoj kisloty. *Sovremennye metody v biohimii. Pod. red. V.N.Orekhovicha. M. Medicina.* 1977. S.66-68.

5. Abu-Saleh N., Ovcharenko E., Awad H. et al. Involvement of the endothelin and nitric oxide systems in the pathogenesis of renal ischemic damage in an experimental diabetic model // *Life Sci.* – 2012. - Vol. 91. № 13-14. P. 669-675.

6. Ahmed S., Mundhe N., Borgohain M. et al. Diosmin Modulates the NF-kB Signal Transduction Pathways and Downregulation of Various Oxidative Stress Markers in Alloxan-Induced Diabetic Nephropathy // *Inflammation.* 2016.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Vol. 39. № 5. P. 1783-1797. doi: 10.1007/s10753-016-0413-4.

7. Bonnefont-Rousselot D., Beaudoux J., Thérond P. et al. Diabetes mellitus, oxidative stress and endothelial dysfunction // *Ann Pharm Fr*. 2004. Vol. 62. № 3. P. 147-157.

8. Ceriello A., Quagliaro L., D'Amico M. et al. Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat // *Diabetes*. 2002. Vol. 51. №4. P. 1076-1082.

9. Ko E., Han J., Jung I., Park W. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells // *J. Smooth Muscle Res*. 2008. Vol. 44. № 2. P. 65-81.

10. Liang W., Chen J., Mo L. et al. ATP-sensitive K⁺ channels contribute to the protective effects of exogenous hydrogen sulfide against high glucose-induced injury in H9c2 cardiac cells // *Int J Mol Med*. 2016. Vol. 37. № 3. P. 763-772. doi: 10.3892/ijmm.2016.2467.

11. Nagareddy P., Xia Z., McNeill J., MacLeod K. Increased expression of iNOS is associated with endothelial dysfunction

and impaired pressor responsiveness in streptozotocin-induced diabetes // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005. Vol. 289. № 5. – P. H2144-2152.

12. Nilius B., Droogmans G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium // *Physiol. Rev*. 2001. Vol. 81. № 4. P. 1415-1459.

13. Shieh C., Coghlan M., Sullivan J., Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities // *J. Pharmacol. Rev*. 2000. Vol. 52. № 4. P. 557-594.

14. Ye C., Shen B., Ren X. et al. An increase in opening of BK(Ca) channels in smooth muscle cells in streptozotocin-induced diabetic mice // *Acta Pharmacol. Sin*. 2004. Vol. 25. № 6. P. 744-750.

15. Zeidner G., Sadjia R., Reuveny E. Redox-dependent Gating of G Protein-coupled Inwardly Rectifying K⁺ Channels // *The Journal of Biological Chemistry*. 2001. Vol. 276. № 38. P. 3564-3570.