

## ОСОБЕННОСТИ АЗОТИСТОГО ОБМЕНА И ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕНИЯ МИОКАРДА ПРИ ИНСУЛИНОВОЙ ГИПОГЛИКЕМИИ У КРЫС

Телушкин П.К.<sup>1</sup>, Стельмах А.Ю.<sup>1</sup>, Медведева Н.Б.<sup>1</sup>, Потапов П.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия Минздрава России» Ярославль, Россия (150000, Ярославль, ул. Революционная, 5), e-mail: stela1973@mail.ru

В миокарде крыс, находящихся в состоянии гипогликемической комы, увеличивается скорость гликолиза и гликогенолиза, активность лактатдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы, повышается концентрация гликогена, снижается содержание триацилглицеролов. На 15-е сутки аллоксанового диабета у крыс снижается скорость дихотомического распада углеводов, содержание триацилглицеролов. У животных, находящихся в состоянии гипогликемической комы, вызванной на фоне сахарного диабета, кроме увеличения скорости гликолиза и гликогенолиза и активности лактатдегидрогеназы, обнаруживается заметное увеличение активности аспарагиновой аминотрансферазы, глутаматдегидрогеназы и АМФ-дезаминазы. В этих условиях распад аминокислот в печени увеличивается, в сыворотке крови повышается концентрация мочевины, мочевой кислоты и уменьшается концентрация свободных аминокислот и триацилглицеролов. Полученные данные свидетельствуют о повышении использования неуглеводных источников для энергообеспечения миокарда при гипогликемии, развивающейся на фоне сахарного диабета.

Ключевые слова: инсулиновая гипогликемия, аллоксановый диабет, сердце, печень, гликолиз, окислительные ферменты, обмен аминокислот.

## FEATURES OF A NITROGENOUS EXCHANGE AND ENERGY SUPPLY OF A MYOCARDIUM AT AN INSULIN HYPOGLYCEMIA IN RATS

Telushkin P.K.<sup>1</sup>, Stelmach A.Y.<sup>1</sup>, Medvedeva N.B.<sup>1</sup>, Potapov P.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Yaroslavl State Medical Academy, Yaroslavl, Russia (Yaroslavl, 150000, Revoliucionnaya 5), e-mail: stela1973@mail.ru

In the myocardium of rats under hypoglycemic coma, the rate of glycolysis glycogenolysis, lactate dehydrogenase, succinate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, the level of glycogene was increased, and the content of triglycerides was decreased. The rate of glycolysis, the level of triglycerides was decreased in rats at 15 days of experimental alloxan diabetes. In rats with hypoglycemia under diabetes mellitus the activity of aspartate aminotransferase, glutamatdehdrogenase, and AMP-desaminase was considerably increased apart from the increasing of the rate of glycolysis, glycogenolysis, activity of lactate dehydrogenase. In these conditions of amino acids in a liver increases. Concentration of urea and uric acid increases in blood serum. Reduction in concentration amino acids an triglycerides is observed. The data received give evidence to the increasing of non-carbohydrate usage for the energy supply of myocardium at hypoglycemia under diabetes mellitus.

Keywords: insulin hypoglycemia, alloxan diabetes, heart, liver, glycolysis, energy metabolism, oxidative enzymes, amino acids exchange

Выраженная гипогликемия (вплоть до развития гипогликемической комы) наблюдается при многих заболеваниях, она является частым следствием неадекватной инсулинотерапии больных сахарным диабетом [1]. Гипогликемия может оказывать серьезное повреждающее воздействие, вызывая изменения ферментативной активности и субстратного обеспечения энергетического и пластического обмена [1, 5].

Нарушения метаболизма в миокарде при сахарном диабете приводят к развитию диабетической кардиомиопатии, существенно нарушающей функцию миокарда [9]. Резкие перепады уровня гликемии, изменения секреции контринсулярных гормонов, нарушения

регуляторных воздействий могут в значительной степени модифицировать метаболический ответ на гипогликемию при сахарном диабете [5, 7].

Целью настоящего исследования являлось изучение особенностей энергообеспечения миокарда при инсулиновой гипогликемии у крыс с экспериментальным сахарным диабетом.

### **Материалы и методы исследования**

Опыты выполнены на белых беспородных крысах самцах массой 200-240 г. Все животные содержались на стандартном пищевом рационе и перед каждым обследованием были лишены пищи в течение 18-24 часов; воду получали без ограничения. Экспериментальный сахарный диабет вызывали однократным внутривентральным введением аллоксана (135 мг на кг массы тела). Развитие сахарного диабета контролировали, определяя наличие кетоновых тел и глюкозы в моче. Гипогликемическую кому (развитие судорожного синдрома с последующей утратой постуральных рефлексов) вызывали внутримышечной инъекцией инсулина в дозе 40 ЕД на кг массы [5]. Животные были разделены на 4 группы: 1-я группа – интактные животные (контроль), 2-я – животные, обследованные на 15-й день после введения аллоксана; 3-я – крысы, находящиеся в состоянии гипогликемической комы; 4-я – животные с 15-суточным экспериментальным сахарным диабетом в состоянии гипогликемической комы.

В сыворотке крови определяли концентрацию глюкозы, мочевой кислоты, мочевины, свободных жирных кислот (СЖК), лактата и триацилглицеролов (ТАГ), и суммарную концентрацию свободных аминокислот [2], в миокарде определяли содержание гликогена и ТАГ [3]. В гомогенате печени и миокарда (оба желудочка) исследовали активность глутаматдегидрогеназы (ГДГ, КФ 1.4.1.3), аланиновой аминотрансферазы (АлАТ, КФ 2.6.1.2), аспарагиновой аминотрансферазы (АсАТ, КФ 2.6.1.1), НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАД-ИЦДГ, КФ 1.1.1.41), лактатдегидрогеназы (ЛДГ, КФ 1.1.1.27), сукцинатдегидрогеназы (СДГ, КФ 1.3.99.1) [3], АМФ-дезаминазы (АМФ-Д, КФ 3.5.4.6) [5]. Активность АсАТ, АлАТ, ГДГ, ЛДГ, НАД-ИЦДГ и СДГ выражали в мкмоль в минуту на г ткани, активность АМФ-Д – в нмоль в минуту на г ткани. Интенсивность гликолиза и гликогенолиза в гомогенате миокарда определяли по скорости накопления лактата в инкубационной среде, используя в качестве субстратов глюкозу, глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф) и гликоген [4]. Количество белка определяли по Лоури. Статистическую обработку проводили с использованием *t* критерия Стьюдента.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

На 15-е сутки у крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом, кроме гипергликемии, обнаружено увеличение концентрации мочевины в крови (таблица 1) и повышение активности АлАТ, АсАТ и ГДГ в печени (таблица 2). Такие изменения

азотистого обмена характерны для экспериментального сахарного диабета [1] и свидетельствуют об увеличении катаболизма аминокислот. Других изменений активности ферментов не обнаружено.

Таблица 1

Концентрация метаболитов в крови крыс при аллоксановом диабете и инсулиновой гипогликемии

Показатель		Группа			
		1-я	2-я	3-я	4-я
Глюкоза	M±m	5,3±0,1 (20)	7,9±0,7 (7)**	1,7±0,1 (7)**	2,1±0,2 (7)**
СЖК	M±m	402±19 (22)	360±41 (7)	316±33 (7)**	202±20 (7) **
Лактат	M±m	2.14±0.11 (19)	2.10±0.18 (8)	1.30±0.10 (8)*	1.90±0.16 (8)
ТАГ	M±m	1,12±0,07 (19)	1,34±0,20 (7)	0,94±0,08 (7)	0,88±0,05 (7)**
Мочевина	M±m	6,8±0.3 (20)	13,6±3,2 (6)*	2,3±0,2 (7)**	22,0±3,8 (7)*
Мочевая кислота	M±m	213±7 (20)	242±14 (7)	226±11 (7)	270±16 (8)*
Аминокислоты	M±m	7,1±0,2 (20)	7,7±0,2 (7)	6.3±0,2 (7)**	3,8±0,3 (7)**

Примечания: 1) концентрация глюкозы, мочевины, лактата, ТАГ и аминокислот в крови выражены в ммоль/л, концентрация мочевой кислоты и СЖК в крови - в мкмоль/л; 2) здесь и в таблицах 2, 3, 4, 5 - \* - P<0,05; \*\* - P<0,01; 3) в скобках указано количество животных в группе.

Таблица 2

Активность ферментов азотистого обмена в печени крыс при аллоксановом диабете и инсулиновой гипогликемии

Показатель		Группа			
		1-я	2-я	3-я	4-я
АсАТ	M±m	15.7±0.4 (24)	18.7±0.6 (7)**	14.1±0.4 (7)	21.3±1.4 (7)**
АлАТ	M±m	24.3±0.6 (24)	28.5± 0.6 (7)**	22.5±0.7 (7)	30.5±1.5 (7)**
ГДГ	M±m	0.61±0.03 (20)	0.80±0.05 (7)*	0.58±0.03 (7)	0.66±0.02 (7)
АМФ-Д	M±m	92±9 (20)	79±8 (6)	83±14 (6)	161±15 (6)**

Гипогликемия (в том числе инсулиновая) во всех случаях вызывает повышенную секрецию глюкокортикоидов, глюкагона и катехоламинов, а метаболические изменения, наблюдаемые у животных, находящихся в состоянии инсулиновой комы, являются результатом противоположно направленных гормональных влияний [1].

У крыс 3-ей группы в крови снижалось содержание субстратов, которые могут служить источниками энергии для миокарда (СЖК, глюкозы, лактата, ТАГ). Кроме того,

обнаруживалось значительное уменьшение концентрации свободных аминокислот и мочевины в крови (таблица 1). Существенных изменений активности окислительных ферментов и ферментов азотистого обмена в печени не обнаружено. Оценивая в целом обнаруженные изменения, можно утверждать, что у животных этой группы катаболизм аминокислот в печени существенно не увеличивался.

У животных 4-ой группы активность исследованных ферментов азотистого обмена в печени была увеличена (таблица 2). Следует подчеркнуть, что повышенная активность АМФ-Д наблюдалась только в состоянии гипогликемической комы у крыс с сахарным диабетом. Реакция, катализируемая АМФ-Д, участвует не только в процессах пуринового обмена, она играет существенную роль в непрямом дезаминировании аминокислот в тканях. Поэтому увеличение активности АМФ-Д одновременно с нарастанием концентрации мочевой кислоты и мочевины в крови указывает на повышение катаболизма как пуриновых нуклеотидов, так и аминокислот [5]. В результате у крыс 4-ой группы значительно уменьшалась концентрация свободных аминокислот в крови. Увеличение распада аминокислот в печени может нарушать субстратное обеспечение синтеза белка. Таким образом, гипогликемия, возникающая при сахарном диабете, способна усугублять нарушения азотистого обмена, характерные для данного заболевания.

Содержание гликогена в миокарде у крыс с аллоксановым диабетом было снижено. В условиях гипогликемической комы концентрация полисахарида повышалась как у исходно здоровых животных, так и у крыс с диабетом (таблица 3). Концентрация ТАГ в миокарде уменьшалась у животных всех групп, изменения были наиболее значительными у крыс 4-ой группы.

Таблица 3

Концентрация гликогена и триацилглицеролов в миокарде при аллоксановом диабете и инсулиновой гипогликемии

Показатель		Группа			
		1-я	2-я	3-я	4-я
Гликоген, мг/г	M±m	2,48±0,10 (23)	2,01±0,36 (7)	4,31±0,59 (7) **	3,68±0,52 (7)*
ТАГ, мкмоль/г	M±m	8,82±0,20 (23)	4,22±0,46 (7)**	7,60±0,42 (8)*	2,77±0,36 (7)**

У крыс с аллоксановым диабетом в миокарде не обнаружено изменений активности ЛДГ, НАД-ИЦДГ и СДГ, у крыс 3 группы, активность этих ферментов повышалась. При гипогликемии у животных с диабетом увеличивалась активность ферментов азотистого обмена (таблица 4).

Таблица 4

Активность ферментов в миокарде крыс при аллоксановом диабете и инсулиновой гипогликемии

Показатель		Группа			
		1-я	2-я	3-я	4-я
ЛДГ	M±m	13,2±0,8 (16)	14,9±1,1 (6)	16,0±0,7 (8)*	17,8±1,3 (8)*
НАД-ИЦДГ	M±m	1,75±0,08 (18)	1,59±0,08 (8)	2,86±0,13 (8)**	1,54±0,06 (8)
СДГ	M±m	6,07±0,36 (16)	5,80±0,20 (7)	7,84±0,32 (5)*	5,57±0,18 (7)
АлАТ	M±m	1,19±0,06 (16)	1,11±0,07 (8)	1,30±0,06 (5)	1,12±0,09 (8)
АсАТ	M±m	7,98±0,28 (16)	8,79±0,46 (8)	9,02±0,41 (5)	9,34±0,32 (8)**
ГДГ	M±m	0,51±0,06 (14)	0,44±0,03 (7)	0,65±0,04 (7)	1,61±0,17 (6)**
АМФ-Д	M±m	741±30 (14)	749±22 (7)	689±22 (7)	842±22 (6)*

У крыс с аллоксановым диабетом (2-ая группа) скорость образования лактата в миокарде уменьшалась почти в 2 раза при использовании всех трех субстратов (таблица 5). Снижение дихотомического распада углеводов в миокарде при аллоксановом диабете является следствием дефицита инсулиновых эффектов [6]. Уменьшение скорости гликогенолиза в данном случае, по-видимому, обусловлено низкой активностью фосфофруктокиназы, которая в таких условиях становилась лимитирующим фактором. У животных 3-ей экспериментальной группы скорость образования лактата в миокарде при использовании в качестве исходных субстратов глюкозы и гликогена, а также активность окислительных ферментов в миокарде увеличивалась. У крыс 4-ей экспериментальной группы интенсивность дихотомического распада углеводов приближалась к нормальным значениям, т.е. была существенно повышена в сравнении с подопытными животными 2-ой группы (аллоксановый диабет), различия статистически достоверны.

Таблица 5

Скорость накопления лактата (нмоль в минуту на мг белка), в миокарде крыс при аллоксановом диабете и инсулиновой гипогликемии

Субстрат		Группа			
		1-я	2-я	3-я	4-я
Глюкоза	M±m	11,4±1,2 (21)	6,3±1,2 (8)*	19,9±1,2 (8)*	12,4±1,7 (8)
Г-6-Ф	M±m	32,1±1,3 (21)	12,4±2,1 (8)*	36,5±1,7 (8)	29,6±2,7 (8)
Гликоген	M±m	20,1±2,1 (21)	12,7±2,6 (8)*	26,7±0,9 (8)*	23,4±3,6 (8)

Повышение скорости образования лактата при использовании глюкозы и гликогена в качестве субстратов фактически отражает активацию гексокиназы и фосфорилазы. Это способствует увеличению образования фосфогексоз. Однако такие изменения

ферментативной активности не обязательно приводят к реальной стимуляции катаболизма углеводов и повышению использования углеводов в энергообмене *in vivo* при гипогликемии. Скорость гликолиза при использовании Г-6-Ф в качестве субстрата не изменялась. Т.е. в сердце активность ключевого фермента дихотомического распада углеводов – фосфофруктокиназы, по-видимому, не увеличивалась. В то же время процессы синтеза гликогена стимулируются инсулином [8]. Поэтому можно предполагать, что под действием высокой дозы гормона, вызывающей в конечном итоге (через 3-4 часа после инъекции) глубокую гипогликемию, повышенное образование фосфогексоз в миокарде способствует увеличению синтеза гликогена, в результате чего концентрация полисахарида значительно нарастает (животные 3-ей и 4-ой группы). В начальный период после введения инсулина, возможно, имело место увеличение «кругооборота» гексоз в системе «Г-6-Ф – гликоген» с некоторым преобладанием синтеза гликогена. В конечном итоге это препятствует его эффективному использованию для покрытия энергозатрат миокарда. В условиях уже развившейся гипогликемии потенциально высокая скорость усвоения глюкозы крови мало влияет на энергообеспечение миокарда. При этом в крови уменьшается не только концентрация глюкозы, но и содержание кетоновых тел [5], СЖК и лактата, т.е. снижается обеспечение миокарда многими потенциально возможными исходными субстратами для окисления. В таких условиях, по-видимому, увеличивается распад эндогенных ТАГ сердца и ТАГ крови, в особенности в том случае, когда инсулиновая гипогликемия развивается на фоне сахарного диабета. Однако инсулин угнетает окисление высших жирных кислот в миокарде [6]. Таким образом, окисление жирных кислот, образующихся при гидролизе ТАГ, может быть затруднено. Поэтому при инсулиновой гипогликемии увеличение активности окислительных ферментов, которое, возможно, носит компенсаторный характер, оказывается малоэффективным.

У животных с гипогликемией, вызванной на фоне сахарного диабета, увеличение активности АсАТ, АМФ-Д и ГДГ в миокарде может свидетельствовать о повышении процессов трансаминирования и дезаминирования с последующим включением аминокислот в энергообмен. Не исключено, что аминокислоты становятся значимым источником энергии для миокарда. В сочетании с нарушениями азотистого обмена в печени это может приводить к снижению субстратного обеспечения протеиносинтеза в сердце.

### **Заключение**

При инсулиновой гипогликемии в миокарде не обнаружено таких изменений активности окислительных ферментов, которые могли бы приводить к нарушению энергообмена. Снижение энергообеспечения может быть вызвано дефицитом исходных субстратов для окисления и нарушением катаболизма углеводов. Инсулиновая

гипогликемия, вызываемая на фоне сахарного диабета, обуславливает заметное увеличение использования аминокислот для покрытия энергозатрат миокарда. Таким образом, нарушения функции миокарда при гипогликемии [9] могут быть обусловлены как дефицитом субстратов энергообмена и нарушением их утилизации, так и ограничением протеиносинтеза.

### Список литературы

1. Балаболкин М.И. Диабетология. – М.: Медицина, 2000. – 672 с.
2. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В.В.Меньшикова. – М., Медицина, 1987. – 368 с.
3. Методы биохимических исследований: Липидный и энергетический обмен / Под ред. М.И. Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 272 с.
4. Панин Л.Е., Третьякова Т.А., Русских Г.С., Войцеховская Е.Э. Особенности регуляции ключевых ферментов гликолиза и пентозофосфатного пути в тканях с различной функциональной специализацией. // *Вопр. мед. химии.* – 1982. – Т. 28, №2. – С. 26-30.
5. Телушкин П.К., Ноздрачев А.Д., Потапов П.П. Показатели энергетического и азотистого обмена у крыс при инсулиновой гипогликемии // *Известия РАН. Серия биологическая.* – 2008. - № 3. – С. 324-332.
6. Belke D. D. Glucose and fatty acid metabolism in the isolated working mouse heart / D. D. Belke, T. S. Larsen, G.D. Lopaschuk, D. L. Severson // *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* – 1999. – Vol. 277, N 4. – P. 1210-1217.
7. Cryer P. E. Mechanisms of sympathoadrenal failure and hypoglycemia in diabetes / P. E. Cryer // *J. Clin. Invest.* – 2006. – Vol. 116. – P. 1470-1473.
8. Laughlin M. R. Regulation of glycogen metabolism in canine myocardium: effects of insulin and epinephrine in vivo / M. R. Laughlin, J. F. Taylor, A. S. Chesnick, R. S. Balaban // *Am. J. Physiol.* – 1992. – Vol. 262. – P. 875-883.
9. O`Donnel, J. M. Coupling of mitochondrial fatty acid uptake to oxidative flux in the intact heart / J. M. O`Donnel, N. M. Alpert, L. T. White, E. D. Lewandowski // *Biophysical Journal.* – 2002. – Vol. 82, N 1. – P. 11-18.

### Рецензенты:

Михайлов В.П., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии ГБОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия Минздрава России», г.Ярославль;

Муравьев А.В., д.б.н., профессор кафедры медико-биологических основ спорта, ФГБОУ ВПО «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского», г.Ярославль.