

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1998

УДК 616.379-008.64-092.9

И. А. Волчегорский, О. Л. Колесников, В. Э. Цейликман, А. А. Колесникова

ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ И ОСТРОЙ ГИПОКСИИ У КРЫС С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ

Кафедра биохимии (зав. — проф. В. В. Саломатин) Челябинской государственной медицинской академии

Через 72 ч после индукции аллоксанового диабета у крыс наблюдается снижение физической работоспособности на фоне повышенной устойчивости к острой гипоксии (асфиксии). Эти сдвиги сопровождаются снижением содержания гликогена и молочной кислоты в скелетной мускулатуре при одновременном увеличении уровня этих веществ в ткани головного мозга. Обсуждается возможная связь описанных феноменов с угнетением метаболизма глюкозы в инсулинзависимой ткани мышц при одновременной интенсификации поступления глюкозы в инсулиннезависимую нервную ткань.

Physical working capacity decreases and resistance to acute hypoxia (asphyxia) increases in rats 72 h after alloxan diabetes induction. These shifts are paralleled by decrease of glycogen content and lactic acid in skeletal muscles and an increase thereof in brain tissue. A probable relationship between these shifts and suppressed glucose metabolism in insulin-dependent muscle tissue during intensified glucose supply to non-insulin-dependent nerve tissue is discussed.

Умеренные физические нагрузки (ФН) при сахарном диабете повышают чувствительность больных к инсулину, что способствует нормализации углеводного и липидного обмена [1, 5, 11]. Целесообразность включения ФН в комплекс лечебных мероприятий при инсулиннезависимом сахарном диабете не вызывает сомнения [1, 11]. Вместе с тем реакция больных инсулинзависимым сахарным диабетом (ИЗСД) на ФН во многом зависит от мощности нагрузки и степени компенсации диабета. Работа супероптимальной мощности при недостаточной компенсированности заболевания приводит к усугублению гипергликемии и развитию кетоацидоза. Вполне возможно, что негативные эффекты ФН высокой интенсивности при диабете могут быть связаны с неудовлетворенностью кислородного запроса головного мозга, на долю которого приходится 20—25% потребляемого в покое O_2 [6]. Известно, что ФН предельной мощности не только увеличивают потребность в кислороде, но и могут вызвать снижение краниальной гемоперфузии даже у профессиональных спортсменов [4]. Вероятность такого нарушения гемодинамики значительно возрастает при ИЗСД, который характеризуется церебральной микроангиопатией и нарушением ортостатической регуляции кровообращения [1, 9]. Не исключено, что усугубление циркуляторной гипоксии мозга при тяжелых ФН вызывает развитие стресс-реакции, усиливающей катаболическую направленность обмена веществ при ИЗСД [1, 11].

Таким образом, имеются основания предположить, что снижение физической работоспособности при ИЗСД [1] является компенсаторно-приспособительным феноменом, направленным на минимизацию кислородного запроса и смягчение церебральной гипоксии. Одним из важных механизмов снижения физической работоспособности при ИЗСД является нарушение инсулинчувствительности и сопутствующее угнетение метаболического потребления глюкозы мышцами [1, 3].

При этом инсулиннезависимое проникновение глюкозы в клетки нервной ткани значительно усиливается. Вероятно, подобное перераспределение глюкозы может обеспечить дополнительную энергопродукцию за счет анаэробного гликолиза в нервной ткани при острой гипоксии мозга. Справедливость высказанного предположения изучалась нами на экспериментальной модели ИЗСД у крыс. В представленной статье анализируются взаимосвязи между изменениями толерантности к ФН, устойчивостью к гипоксии, а также уровнем метаболитов углеводного обмена в крови, мозге и скелетных мышцах.

Материалы и методы

В работе использованы половозрелые крысы-самцы Вистар массой тела 200—250 г. После предварительной 24-часовой депривации пищи (при сохраненном доступе к воде) у крыс моделировали ИЗСД путем внутрибрюшинного введения аллоксана тригидрата ("La Chema", Чехия) в дозе 200 мг/кг [10]. Контрольные животные получали эквивалентную инъекцию 0,9% NaCl.

Через 72 ч после введения аллоксана, на фоне предварительного лишения пищи в течение суток, животных забивали с целью изучения ИЗСД-обусловленных метаболических сдвигов. В этой серии экспериментов определяли уровни гликемии и лактатемии, а также содержание свободных жирных кислот (СЖК) и триглицеридов (ТГ) в крови. Одновременно исследовали содержание гликогена и молочной кислоты в головном мозге и скелетной мускулатуре (квадрицепс бедра).

Показатели гликемии регистрировали энзиматически при помощи стандартных наборов реактивов ("La Chema", Чехия). Уровень молочной кислоты в цельной крови и тканях определяли колориметрически [15]. Концентрацию СЖК в ЭДТА-стабилизированной плазме крови регистрировали экстракционно-колориметрическим методом [12]. Концентрацию ТГ в сыворотке крови опре-

Таблица 1

Метаболические проявления диабета у крыс через 3 сут после введения аллоксана ($M \pm m$)

Показатель	Группа животных		p
	интактный контроль	аллоксановый диабет	
Масса тела, % от исходной	101,01 ± 0,53 (n = 5)	84,86 ± 2,21 (n = 7)	< 0,001 (t)
Гликемия, мМ/л	4,47 ± 0,42 (n = 5)	29,13 ± 6,01 (n = 7)	< 0,01 (t)
Лактатемия, мМ/л	5,74 ± 0,66 (n = 16)	6,85 ± 0,67 (n = 16)	> 0,05
Триглицеридемия, мМ/л	0,35 ± 0,05 (n = 5)	2,01 ± 0,67 (n = 7)	< 0,05 (t)
СЖК плазмы крови, мэкв/л	0,20 ± 0,02 (n = 9)	0,16 ± 0,02 (n = 9)	< 0,05 (ТМФ)
Гликоген мышц, мг/100 г ткани	188,0 ± 15,1 (n = 9)	134,6 ± 25,6 (n = 9)	< 0,05 (ТМФ)
Лактат мышц, мМ/100 г ткани	3,9 ± 0,6 (n = 15)	3,0 ± 0,5 (n = 16)	< 0,05 (ТМФ)
Гликоген мозга, мг/цельный мозг	4,7 ± 0,5 (n = 12)	7,2 ± 0,7 (n = 12)	< 0,01 (t)
Лактат мозга, (мМ/цельный мозг) · 10 ⁻²	2,3 ± 0,2 (n = 6)	5,2 ± 0,5 (n = 7)	< 0,001 (t)

Примечание. Достоверность различий (p) оценивали при помощи t-критерия Стьюдента и точного метода Фишера (ТМФ). Здесь и в табл. 2: n — число животных.

деляли на биохимическом анализаторе фирмы KONE (Финляндия). Содержание гликогена в тканях исследовали с помощью нефелометрического метода [14].

Дополнительно проводили исследование гликолитического потребления глюкозы *in vitro* гомогенатами мозга здоровых и больных ИЗСД крыс. Инкубационная среда, приготовленная на основе раствора Кребса, содержала 10 мМ/л глюкозы, 119 мМ/л NaCl, 4,7 мМ/л KCl, 3,5 мМ/л CaCl₂, 1,2 мМ/л KH₂PO₄, 2,4 мМ/л MgSO₄, 25 мМ/л NaHCO₃. 0,5 мл 25% гомогената мозга, приготовленного на свободной от глюкозы среде, смешивали с 0,5 мл глюкозосодержащей среды. 0,05 мл полученной смеси забирали для определения лактата на "нулевой" момент времени. Затем, после 2-часовой инкубации при 37°C, повторно определяли содержание молочной кислоты. Скорость накопления лактата рассчитывали на цельный мозг по разнице между конечным уровнем молочной кислоты и ее содержанием на "нулевой" момент времени.

В отдельной серии экспериментов изучали устойчивость к ФН и чувствительность к острой гипоксии через 3 сут после инъекции аллоксана. Устойчивость к физической нагрузке оценивали по длительности принудительного плавания при температуре воды 17–18°C. Чувствительность к гипоксии изучали при помощи метода [7], модифицированного нами для работы с крысами (принцип метода заключается в регистрации латентности развития гипоксической комы по критерию прекращения спонтанных движений у животных, помещенных под воду).

Результаты обработаны статистически. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента (t), а также при помощи точного метода Фишера. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Через 72 ч после введения аллоксана у крыс развивались метаболические сдвиги, характерные для ИЗСД (табл. 1). Уровень гликемии натошак возрастал в 6,5 раза, а содержание ТГ в сыворотке крови повышалось в 5,7 раза. Содержание молочной кислоты в крови проявляло статистически незначимую тенденцию к приросту. Тяжесть метаболических расстройств при использованной модели ИЗСД иллюстрируются фактом гибели 26,5% крыс к 4-м суткам после инъекции аллоксана (из 117 крыс с экспериментальным ИЗСД погибло 31 животное).

На 4-е сутки с момента индукции ИЗСД было отмечено снижение концентрации циркулирующих СЖК на 20% (см. табл. 1). Скорее всего, этот феномен связан с недостаточным синтезом липопротеинлипазы, которая является инсулинзависимым ферментом [11] и вносит существенный вклад в поддержание уровня СЖК крови [13]. Повидимому, развитие гипертриглицеридемии при аллоксановом диабете тоже в значительной степени связано с дефицитом активности липопротеинлипазы, контролирующей удаление ТГ из крови и их депонирование в жировой ткани [11]. Нарушение депонирования ТГ в жировой ткани может рассматриваться как основа не только гипертриглицеридемии, но и снижения массы тела больных крыс (см. табл. 1).

Введение аллоксана приводило к существенно угнетению метаболизма глюкозы в мышечной ткани. Это проявлялось снижением содержания гликогена на 28% и молочной кислоты на 23% в квадрицепсе бедра (см. табл. 1). Поскольку мышечная ткань является самым крупным инсулинзависимым "потребителем" глюкозы [11, 13], описанные сдвиги следует рассматривать как следствие дефицита секреции инсулина [10] и вторичной инсулинрезистентности при аллоксановом диабете [3]. Сниженное потребление глюкозы ограничивает способность мышечной ткани к энергообеспечению собственных функций. При этом дефицит энергопродукции усугубляется снижением концентрации циркулирующих СЖК (см. табл. 1), окисление которых обеспечивает генерацию макроэргов в мышечных волокнах на фоне стрессорной инсулинрезистентности [8]. Таким образом, угнетение обмена глюкозы в мышцах и сопутствующее снижение уровня СЖК в крови целесообразно рассматривать как метаболическую основу уменьшения физической работоспособности при аллоксановом диабете. Справедливость этого вывода иллюстрируется ускоренным (на 42%) развитием утомления в процессе принудительного плавания больных крыс (табл. 2).

Содержание гликогена и лактата в головном мозге крыс с ИЗСД изменялось совершенно иным образом по сравнению с мышечной тканью. Как видно из табл. 1, к 4-му дню после введения аллоксана уровни гликогена и молочной кислоты оказались повышенными на 53 и 126% соответственно. Скорее всего, прирост содержания лактата в нервной ткани не связан с увеличением активности ферментов гликолиза, так как скорости образования молочной кислоты в глюкозосодержащей среде гомогенатами мозга здоровых и больных ИЗСД крыс *in vitro* не различались между со-

Изменения физической работоспособности и устойчивости к острой гипоксии у крыс через 3 сут после введения аллоксана ($M \pm m$)

Группа животных	Длительность принудительного плавания, мин	Латентность развития гипоксической комы, с
Интактный контроль	$16,7 \pm 2,6$ ($n = 11$)	$78,2 \pm 3,0$ ($n = 20$)
Аллоксановый диабет	$9,7 \pm 1,0^*$ ($n = 9$)	$87,6 \pm 3,5^*$ ($n = 23$)

Примечание. Звездочка — различия с контролем достоверны при $p < 0,05$ по t -критерию Стьюдента.

бой: $4,57 \pm 0,35$ $\text{мМ} \cdot 10^{-2}/\text{мозг/ч}$ ($n = 6$) против $4,55 \pm 0,34$ $\text{мМ} \cdot 10^{-2}/\text{мозг/ч}$ ($n = 7$; $p > 0,05$ соответственно). Не исключено, что накопление гликогена в мозге крыс с аллоксановым диабетом является причиной усиленного образования лактата мозгом *in vivo*.

Полученные результаты хорошо согласуются с общепринятыми представлениями об усиленном проникновении глюкозы в нервную ткань при ИЗСД, что считается важным механизмом развития диабетической нейропатии [1]. По-видимому, усиленное потребление глюкозы тканью мозга при диабете имеет не только негативное, но и определенное компенсаторно-приспособительное значение. Так, накопление гликогена в мозге крыс с аллоксановым диабетом можно рассматривать как один из механизмов компенсации снижения церебрального кровотока при ИЗСД [9]. Эта компенсация, скорее всего, достигается за счет усиления анаэробной, гликолитической энергопродукции, что и приводит к накоплению молочной кислоты в ткани мозга. Стоит добавить, что умеренное накопление лактата в тканях при гипоксии рассматривается как адаптивный феномен, направленный на смягчение гипоксической альтерации клеток [2].

Таким образом, накопление гликогена и лактата в ткани мозга крыс с аллоксановым диабетом можно рассматривать как метаболическую основу устойчивости организма к гипоксии. Целесообразность такой постановки вопроса подтверждается фактом достоверного прироста (на 12%) латентности развития гипоксической комы у больных крыс (см. табл. 2). При этом известно, что удовлетворенность энергетических запросов центральной нервной системы является критическим фактором, определяющим выживание в условиях острой гипоксии [2].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что угнетение метаболизма глюкозы в скелетной мускулатуре сопровождается накоплением гликогена и усилением анаэробного гликолиза в мозге крыс с аллоксановым диабетом. По-видимому, такое перераспределение отражает преимущественное потребление глюкозы инсулиннезависимыми тканями при ИЗСД в ущерб инсулинзависимым тканям. Такая ситуация приводит к разнонаправленным изменениям энергообеспечения мускулатуры и мозга и как следствие к разнонаправленным сдвигам физической работоспособности и переносимости острой асфиксии. При этом само снижение физической работоспособности является фактором, уменьшающим общий кислородный

запрос организма [4]. Вполне возможно, что выявленные метаболические и функциональные сдвиги составляют основу компенсаторно-приспособительной реакции, смысл которой состоит в смягчении последствий нарушения мозгового кровообращения при ИЗСД.

Выводы

1. Через 3 сут после индукции аллоксанового диабета наблюдается снижение содержания гликогена и молочной кислоты в скелетной мускулатуре, что свидетельствует об угнетении метаболического потребления глюкозы инсулинзависимой тканью поперечнополосатых мышц.

2. Аллоксановый диабет у крыс сопровождается развитием гипертриглицеридемии на фоне одновременного снижения уровня циркулирующих СЖК и уменьшения массы тела. Комплекс этих сдвигов позволяет судить о вероятном подавлении активности липопротеинлипазы и нарушенном депонировании ТГ в жировой ткани.

3. Угнетение метаболизма глюкозы в мышечной ткани и одновременное уменьшение концентрации СЖК в плазме крови снижает доступность энергетических субстратов для мышечной ткани и как следствие уменьшает физическую работоспособность крыс с аллоксановым диабетом.

4. Через 72 ч с момента индукции аллоксанового диабета наблюдается увеличение содержания гликогена и лактата в головном мозге больных крыс, что свидетельствует об увеличенном потреблении глюкозы инсулиннезависимой нервной тканью.

5. Увеличение содержания гликогена в ткани мозга и одновременная активация гликолиза оптимизируют церебральную энергопродукцию в анаэробных условиях и как следствие увеличивают устойчивость крыс с аллоксановым диабетом к острой гипоксии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балаболкин М. И. Сахарный диабет. — М., 1994.
2. Биленко М. В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов (молекулярные механизмы, пути предупреждения и лечения). — М., 1989.
3. Волчегорский И. А., Колесников О. Л., Цейликман В. Э. и др. // Пробл. эндокринологии. — 1997. — № 2. — С. 38–41.
4. Карпман В. Л., Любина Б. Г. Динамика кровообращения у спортсменов. — М., 1982.
5. Кило И., Уильямсон Дж. Что такое диабет? Факты и рекомендации: Пер. с англ. — М., 1993.
6. Коростовцева Н. В. Повышение устойчивости к гипоксии. — Л., 1976.
7. Кулинский В. И., Ольховский И. А., Ковалевский А. Н. // Бюл. exper. биол. — 1986. — № 6. — С. 669–671.
8. Панин Л. Е. Биохимические механизмы стресса. — Новосибирск, 1983.
9. Ромоданов А. П., Потанов А. И. // Вопр. нейрохир. — 1990. — № 3. — С. 19–22.
10. Саркисов Д. С., Ремезов П. И. Воспроизведение болезней человека в эксперименте. — М., 1960.
11. Теппермен Дж., Теппермен Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы: Пер. с англ. — М., 1989.
12. Duncome W. G. // Clin. chim. Acta. — 1964. — Vol. 9. — P. 122–125.
13. Fanelli C. G., De Feo P., Porcellati F. et al. // J. clin. Invest. — 1992. — Vol. 89. — P. 2005–2013.
14. Hansen R. G., Rutter W. J., Craine E. M. // J. biol. Chem. — 1952. — Vol. 195. — P. 127–132.
15. Strom G. // Acta physiol. scand. — 1949. — Vol. 17. — P. 440–451.

Поступила 20.01.98