

Резюме

ЭКОЛОГО-ГИГИЕНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА
САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО
СОСТОЯНИЯ РАПЫ ШАБОЛАТСКОГО
(БУДАКСКОГО) ЛИМАНА

*Мокиенко А.В., Николенко С.И.,
Недолуженко Д.И., Ковалева И.П.*

В работе представлены результаты эколого-гигиенической оценки санитарно-микробиологических показателей рапы Шаболатского (Будакского) лимана. Обоснована вероятность сброса бытовых и промышленных сточных вод в лиман и необходимость продолжения исследований эколого-гигиенического состояния рапы лимана.

Ключевые слова: лиман, рапа, санитарно-микробиологические показатели, эколого-гигиеническая оценка

Summary

ECOLOGY-HYGIENIC ESTIMATION OF
SANITARY-MICROBIOLOGICAL
CONDITION OF HIGHLY MINERAL WATER
OF SHABOLATSKY (BUDAKSKY) ESTUARY

*Mokiyenko A.V., Nikolenko S.I.,
Nedoluzhenko D.I., Kovalyova I.P.*

In work results ecology-hygienic estimation of sanitary-microbiological indicators of highly mineral water Shabolatsky (Budaksky) estuary are presented. The probability of dump of household and industrial sewage in estuary and necessity of continuation of researches ecology-hygienic condition highly mineral water estuary is proved.

Keywords: estuary, highly mineral water, sanitary-microbiological indicators, ecology-hygienic estimation

*Впервые поступила в редакцию 11.10.2010 г.
Рекомендована к печати на заседании
редакционной коллегии после рецензирования*

УДК 591.21-001.127-002.599.323.4]:612.1

**ПРИЧИННО-НАСЛІДКОВІ ВІДНОСИНИ В РЕМОДЕЛЮВАННІ
СЕРЦЯ ЗА УМОВ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ В ЩУРІВ**

Барінов Е.Ф., Канана Н.М.

Донецький національний медичний університет ім. М. Горького

Ключові слова: цукровий діабет, ремоделювання серця

В основі реалізації морфогенетичної програми ремоделювання серця за умов цукрового діабету (ЦД) лежить включення експресії більш тисячі генів [3]. Активізація експресії генів визначає амплітуду й характер реакції структурних елементів серця на дію патогенетичних факторів діабету: розвиток гіпертрофії за рахунок експресії міофіламентів і білків цитоскелету, зміна електричної стабільності серця внаслідок модифікації роботи іонних каналів і насосів плазмолемі, Ca²⁺-зв'язуючих білків саркоплазматичного ретикулула, перебудови щільових з'єднань та ін.[6-8]. Очевидно, що в основі цих змін лежить ініціація в клітинах генетичної про-

грами ремоделювання. По суті, набір генів, які включаються, визначається «запитом організму», сигналами, що діють на кардіоміоцити й систему їхнього мікрооточення [5]. Виходячи з цього, можна постулювати, що стадійність причинно-наслідкових відносин за умов розвитку дилатативної кардіоміопатії й серцевої недостатності, багато в чому, залежить від характеру й виразності зміни нейрогуморальної регуляції, сенситивності мішеней до ключових регуляторів кардіального ремоделювання й ефективності роботи внутрішньоклітинних сигнальних систем, що контролюють Ca²⁺-гомеостаз. Рівень внутрішньоклітинного Ca²⁺ визна-

чає силу й швидкість серцевих скорочень у систолу, якість розслаблення в діастолу, апоптоз при порушенні трофіки й регуляції й ін. [3, 4] Багатофакторність регуляції скорочувальної функції міокарда визначає необхідність аналізу стану різних елементів внутрішньоклітинної сигнальної системи (протеїнкінази А і С, інозитол-3-фосфату, системи негативного контролю - eNOS-Протеїнкіназа G). Одним із ключових системних регуляторів за умов ЦД вважається Ангіотензин II (АнгII) [5, 7]. Останній може індукувати різні морфогенетичні процеси в міокарді – від гіпертрофії до апоптоза кардіоміоцитів. Крім того, зміна активності ренін-ангіотензинової системи (РАС) і чутливості AT_1 рецепторів клітин-мішеней розцінюють як фактор ризику розвитку ендотеліальної дисфункції, що визначає порушення мікроциркуляції й ішемічне ушкодження серцевого м'язу [3, 6]. Не менше значення має прооксидантний і прозапальний ефекти АнгII, що визначають оксидативний і цитокіновий механізми ушкодження кардіоміоцитів, яке супроводжується стимуляцією фіброгенезу в міокарді [4, 8]. Очевидно, що превалювання того або іншого ефекту АнгII залежить від чутливості відповідних рецепторів і внутрішньоклітинного гомеостазу мішеней. Однак, дотепер мало даних щодо взаємозв'язку між активністю регуляторних систем, ефективністю функціонування внутрішньоклітинної сигналізації і структурною перебудовою міокарда. Якщо в експериментальних дослідженнях доступний мікроскопічний аналіз стану серця, то в клінічних умовах основними показниками ремоделювання є дані ультразвукового дослідження геометрії серця. При обох методичних підходах перспективним представляється пошук причинно-наслідкових зв'язків між патохімічними змінами в організмі й динамічною ремоделювання серця, що й явилось метою даної роботи.

Матеріал и методи дослідження

Експерименти виконані на 46 щурах лінії Вістар. Моделювання ЦД 1 типу

проводили після 18-годинного голодування шляхом введення алоксану (16 мк/кг) в хвостову вену тварин [6]. Показником розвитку інсулярної недостатності вважали підвищення рівня глюкози в крові більш 12 ммоль/л на 14 добу експерименту. Аналіз чутливості рецепторів та стану внутрішньоклітинних сигнальних систем проводили через 14 діб, 1, 2 і 3 міс після початку експерименту методом інгібіторного аналізу в тесті *in vitro* з індукованою агрегацією тромбоцитів [1]. В якості індуктора використовували АнгII, який вводили у суспензію у вигляді концентрованого розчину (5-15 мкл), таким чином, щоб кінцева концентрація індуктора агрегації в пробі складала 0,25-2 мкМ. На основі проведених досліджень визначали EC_{50} – ефективну концентрацію агоністу, що викликає 50% агрегацію тромбоцитів [1]. Для оцінки активності внутрішньоклітинних сигнальних систем використовували комбінацію агоніста, стимулятора чи інгібітору в наступних концентраціях: АнгII – EC_{50} , трифазин (інгібітор системи Ca^{2+} -кальмодулін) – 2 мкМ, L-аргінін (субстрат, який стимулює активність eNOS) – 200 мкМ; L-NAME (інгібітор eNOS) – 1 мкМ; ODQ (1H-[1,2,4]оксадіазоло[4,3-а]квиноксалін-1 (інгібітор ГЦ) – 10 мкМ, H89 (інгібітор ПкА) – 10 нМ, стауроспорин (інгібітор ПкС) – 50 нМ, теофілін (інгібітор фосфодіестераз) – 5 мкМ. Проби інкубували при 20°C протягом 8-9 хв, перемішуючи зі швидкістю 1000 об/хв. Результати зміни агрегації тромбоцитів виражали у відсотках відносно показника, зареєстрованого під час інкубації з АнгII.

В аналогічний термін досліджували масу тіла тварин (m_b), абсолютну (m_h) й відносну масу серця (m_h/m_b), аналізували геометричні показники камер серця. Об'єм правого й лівого шлуночків серця (V_{RV} й V_{LV}) оцінювали за методом Grover et al. [5], заснованим на визначенні обсягу фізіологічного розчину, що вводили у камери серця. Надалі видаляли передсердя, для чого виконували розріз паралельно атріо-вентрикулярній межі. При

ромеженні шлуночків 2/3 міжшлуночкової перегородки відводили до ЛШ й 1/3 – до ПШ [7]. Оцінювали масу кожного з шлуночків (m_v), їхнє відношення до маси серця (m_v/m_h), вимірювали товщину стінки кожного з шлуночків (Т) у основи, в середній частині й на верхівці шлуночку. Розраховували відношення Т/В. Всі результати обробляли статистично з використанням критеріїв параметричної й непараметричної статистики. Проводили кореляційний аналіз з оцінкою коефіцієнту рангової кореляції Спірмена, кореляційного аналізу. Вірогідність розходжень реєстрували при $p < 0,05$.

Результати дослідження

У інтактних тварин маса тіла дорівнювала 200 ± 22 г. EC_{50} АнгII складала $0,85 \pm 0,02$ мкМ. Додавання L-аргініну викликало зниження АТ на $16,3 \pm 1,97\%$ ($p < 0,05$), тоді як L-NAME підсилював АТ на $17,3 \pm 2,67\%$ ($p < 0,05$), що відбивало резервну потужність і реальну активність eNOS відповідно. Ефект ТФЗ складав $15,8 \pm 3,1\%$, що відбивало зв'язок активації eNOS з Ca^{2+} -залежним механізмом. Інкубація з H89 призводила до зростання агрегації тромбоцитів на $8,2 \pm 2,1\%$, тоді як антиагрегантний ефект інгібітора ПкС склав $7,8 \pm 1,7\%$.

Через 14 діб після ін'єкції алоксану рівень глікемії досягав $13,5 \pm 1,9$ ммоль/л. Це супроводжувалося вірогідним підвищенням EC_{50} АнгII, що відбивало зниження чутливості АТ₁ рецепторів. Однак розподіл цього показника відрізнявся від нормального, що було пов'язано з індивідуальними особливостями активності РАС. Загальна закономірність полягала у початковому зниженні чутливості АТ₁ рецепторів з наступним підйомом, але терміни і вираженість цих змін мали індивідуальні особливості. Для подальшого дослідження відібрали щурів з тенденцією до гіперчутливості АТ₁ рецепторів. Через 14 діб в даній групі тварин EC_{50} АнгII зросла на $21,11\%$ порівняно з контролем ($p < 0,05$). Це супроводжувалося підйомом активності eNOS на $22,59\%$ ($p < 0,05$), ГЦ на $44,77\%$ ($p < 0,01$), актив-

ності Пк на $14,63\%$ і ПкС $10,26\%$ порівняно з контролем ($p < 0,05$). Такі зміни можуть відбивати активацію РАС і внутрішньоклітинні адаптаційні реакції, спрямовані на обмеження внутрішньоклітинного рівня Ca^{2+} . За цих умов спостерігалось зростання маси серця за рахунок збільшення маси та товщини стінки ЛШ. Судячи з даних кореляційного аналізу, провідну роль в розвитку гіпертрофії в цей ранній термін ЦД відіграє активація ПкА ($r = 0,624$; $P = 0,001$) та eNOS ($r = 0,506$; $P = 0,001$), і в меншому ступені вона залежить від чутливості АТ₁ рецепторів ($r = 0,394$; $P = 0,01$) і ПкС ($r = 0,311$; $P = 0,04$).

Через 1 міс після моделювання ЦД ситуація дещо змінилася. EC_{50} для АнгII зменшувалася на $12,62\%$ ($p < 0,05$) відносно попереднього терміну дослідження і мало відрізнялася від контролю. Це відбувалося на тлі обмеження компенсаторного підйому активності eNOS. Ефект L-NAME знизився на $11,79\%$ порівняно з попереднім строком ($p < 0,05$), але на $8,09\%$ ($p < 0,05$) перевищував показник в інтактних щурів. Підтримання підвищеної продукції оксиду азоту та вірогідно простагландинів підтверджувалося при використанні інгібітора ГЦ. Незважаючи на зниження активності ГЦ на $12,54\%$ ($p < 0,05$), дана величина залишалася на $28,36\%$ ($p < 0,01$) вищою за контроль. На відміну від цього активність ПкА поверталася до рівня інтактних щурів. Однак реалізація ефектів циклічних нуклеотидів (цАМФ і цГМФ) викликає сумніви з огляду на підвищення активності ФДЕ. Проагрегантний ефект теофіліну зріс на $15,56\%$ і $23,81\%$ порівняно з попереднім терміном дослідження та контролем відповідно ($p < 0,05$). Такі зміни можуть відбивати підвищення про Ca^{2+} -сигналів в клітинах-мішенях, що підтверджувалося й зростанням активності ПкС – на $19,77\%$ ($p < 0,05$) і $32,05\%$ ($p < 0,01$) відносно показника на 14-у добу експерименту та в інтактних щурів відповідно.

В цей термін дослідження зареєстроване прогресування гіпертрофії серця, маса якого на $37,3\%$ ($p < 0,01$) перевищи-

ла показник в контролі. Збільшення абсолютної маси серця було пов'язане зі зростанням маси переважно ЛШ. Вона на 44% перевищувала ($p < 0,01$) показник в контролі, а T_{LV} за 1-й місяць зросла на 17,5% відносно показника в інтактних тварин ($p < 0,05$). Об'єм камер серця при цьому змінювався мало – на 5-8% порівняно з контролем. Проведення кореляційного аналізу дозволило визначити, що провідним фактором гіпертрофії серця в цей термін дослідження є активність ПкС ($r = 0,661$; $P = 0,001$). За цих умов зареєстроване зменшення ролі eNOS ($r = 0,394$; $P = 0,01$) і ГЦ ($r = 0,412$; $P = 0,005$), зростання ролі AT_1 рецепторів ($r = 0,589$; $P = 0,001$) та нівелювання ефектів ПкА ($r = 0,213$; $P = 0,1$).

Протягом 2-го міс ЦД відзначалося незначне зниження маси серця – на 4,3% порівняно з показником у попередньому місяці, проте вона, як і раніше, перевищувала таку в інтактних тварин. Зниження маси ЛШ на 5,6% щодо попереднього строку дослідження ($p = 0,06$) супроводжувалося збільшенням маси ПШ на 10,3% ($p < 0,05$). При цьому маса ЛШ і ПШ були на 36,0% й 33,3% ($p < 0,01$) вище за такі в інтактних щурів, тим самим відбиваючи розвиток гіпертрофії обох шлуночків серця.

Гіпертрофія супроводжувалася збільшенням об'єму камер серця – на 18,5% для ЛШ ($p < 0,05$) і на 8,0% для ПШ ($p = 0,05$) у порівнянні з попереднім строком дослідження. Внаслідок цього дані показники перевищили контроль на 30,1% ($p < 0,01$) і 17,4% ($p < 0,05$) відповідно. Дилатація шлуночків супроводжувалася зменшенням товщини стінки ЛШ – на 7,5% порівняно з попереднім терміном дослідження ($p < 0,05$). Ознаки декомпенсації, що розвиваються в лівому відділі серця були прямо пов'язані зі зміною регуляції серцево-судинної системи й внутрішньоклітинних механізмів контролю компенсаторно-приспосувальних і патологічних змін.

Зменшення товщини стінки ЛШ і збільшення об'єму його камери тісно ко-

релювало зі зниженням EC_{50} АнгII на 20% щодо попереднього строку дослідження ($p < 0,05$) і на 15,29% ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем – відповідно $r_1 = 0,548$ й $r_2 = -0,616$ ($P = 0,001$). Однак більш тісним виявився зв'язок між сенситивністю AT_1 рецепторів і відношенням T_{LV}/V_{LV} ($r = 0,792$, $P = 0,001$). Важливим також можна вважати зв'язок між зниженням товщини ЛШ, T_{LV}/V_{LV} й активністю eNOS ($r_1 = 0,512$, $r_2 = -0,556$; $P < 0,001$).

Мала місце виражена залежність ремоделювання ЛШ від наростаючої активності ФДЕ. Ефект ТФ виріс на 18,59% ($p < 0,05$) й 46,83% ($p < 0,01$) щодо попереднього терміну дослідження й контролю відповідно. Кореляційна залежність між активністю ФДЕ й товщиною ЛШ, об'ємом ЛШ, T_{LV}/V_{LV} склала відповідно $r_1 = -0,448$ ($P = 0,002$); $r_2 = 0,462$ ($P = 0,001$) й $r_3 = -0,610$ ($P < 0,001$). Цей зв'язок реалізовувався на фоні вираженої залежності T_{LV}/V_{LV} від активності ПкС ($r = -0,691$; $P < 0,001$).

Через 3 міс відзначалося зниження як абсолютної, так і відносної маси серця – на 31,8% й 24,2% відповідно ($p < 0,01$). Ремоделювання серця було пов'язано зі зниженням маси ЛШ на 33,8% ($p < 0,01$). Причому основну роль у зміні структури серця грало наростання об'єму ЛШ на 38,2% ($p < 0,01$) і зниження товщини його стінки на 15,0% ($p < 0,05$) щодо контролю. Як наслідок, відношення T/V прогресивно знижувалося й через 3 місяця виявилось на 38,5% ($p < 0,01$) нижчим за контроль, відбиваючи превалювання в ці строки дилатації над гіпертрофією. Ці зміни розвивалися на фоні вираженої гіперсенситивності AT_1 рецепторів: EC_{50} для АнгII знизилася протягом 3 місяці на 29,17% ($p < 0,01$) і стала на 40% нижчою за контрольний рівень ($p < 0,01$). Це було тісно пов'язане з динамікою T і V ($r_1 = 0,662$; $r_2 = -0,701$; $P < 0,001$), але максимально - з відношенням T/V ($r_1 = 0,784$, $P < 0,001$). Цей феномен розвивався на фоні вираженого пригнічення eNOS, активність якої знизилася на 22,31% ($p < 0,05$) у порівнянні з попереднім строком дослідження й на 45,67% щодо кон-

тролю ($p < 0,01$). Активність eNOS помірно позитивно корелювала з Т ($r_1 = 0,396$, $P = 0,01$) і негативно – з об'ємом ЛШ ($r_2 = -0,410$; $P = 0,005$). Відзначалося зниження активності ГЦ на 26,87% у порівнянні з інтактними тваринами, при цьому активність ФДЕ збільшилася на 10,6% ($p < 0,05$) і виявилася на 61,9% вищою за контроль ($p < 0,01$). Дані зміни, по суті обмежують зниження внутрішньоклітинного пула циклічних нуклеотидів і відбивають підвищення рівня внутрішньоклітинного Ca^{2+} , що супроводжує такі процеси як запалення, порушення мікроциркуляції, релаксації шлуночків та ін. Крім того, внутрішньоклітинний Ca^{2+} є одним з факторів порушення деполяризації сарколеми кардіоміоцитів, асоційованого зі шлуночковими аритміями. У тварин з гіперсенситивністю AT_1 рецепторів за умов ЦД виявлений виражений зв'язок активності ФДЕ з показниками розвитку дилатативної кардіоміопатії ($r_{\text{ФДЕ-Т}} = -0,414$, $P = 0,005$; $r_{\text{ФДЕ-V}} = 0,449$, $P = 0,002$; $r_{\text{ФДЕ-Т/V}} = -0,507$, $p < 0,001$). Важливим фактором у порушенні структурно-функціонального стану міокарда й розвитку дилатативної кардіоміопатії має також підвищення активності ПкС, стимуляція якої супроводжувалася більш ніж двократним зростанням ефекту стауроспорину. Розрахунки виявили наступне: $r_{\text{ПкС-Т}} = 0,545$; $r_{\text{ПкС-V}} = 0,624$, $r_{\text{ПкС-Т/V}} = -0,760$ ($p < 0,001$), що відбиває роль гіперактивності ПкС в розвитку діабетичної кардіоміопатії.

Висновки

Виявлено стадійність регуляції процесу ремоделювання міокарда за умов ЦД. У ранній термін ключовими факторами розвитку гіпертрофії серця були активація ПкА й eNOS-ГЦ. З кінця 1 міс ключового значення набувало підвищенням чутливості AT_1 рецепторів і активності ПкС. Ці зміни на фоні пригнічення eNOS і ПкС та стимуляції ФДЕ відігравали вирішальну роль в ініціації дилатативної кардіоміопатії через 3 місяці після моделювання аллоксанового діабету.

Література

1. Баринов Э.Ф., Сулаева О.Н., Волошин В.В., Терещук Б.П. Динамика чувствительности AT_1 рецепторов у крыс после односторонней обструкции мочеточника // Проблемы, достижения и перспективы развития мед.-биол. наук и практик. Здоровоохр. – 2006. Т. 142, Ч. 3. – С. 15-19.
2. Лях Ю.Е., Гур'янов В.Г., Хоменко В.Н., Панченко О.А. Основы компьютерной биостатистики. – Д., 2006. – 211 с.
3. Marwick T.H. Diabetic heart disease // Heart. – 2006. – Vol. 92. – P. 296-300.
4. Maharsy W.M., Kadi L.N., Issa N.G., Bitar K.M. Cross-talk related to insulin and angiotensin II binding on myocardial remodelling in diabetic rat hearts // J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst. – 2007. – Vol. 8. – P. 59-65.
5. Pieske B., Wachter R. Impact of diabetes and hypertension on the heart // Curr. Opin. Cardiol. – 2008. – Vol. 23, № 4. – P. 340-349.
6. Reuter H., Adam C. The increased angiotensin II (type 1) receptor density in myocardium of type 2 diabetic patients is prevented by blockade of the renin-angiotensin system // Diabetologia. – 2006. – Vol. 49. – P. 3067-3074.
7. Spinetti G., Kraenkel N. Diabetes and vessel wall remodelling: from mechanistic insights to regenerative therapies // Cardiovasc. Res. – 2008. – Vol. 78. – P. 65-73
8. Swynghedauw B. Phenotypic plasticity of adult myocardium: molecular mechanisms // J. Exp. Biol. – 2006. – Vol. 209. – Pt. 12. – P. 2320-2327.
9. Zhou B.Q., Hu S.J., Wang G.B. The analysis of ultrastructure and gene expression of sarco/endoplasmic reticulum calcium handling proteins in alloxan-induced diabetic rat myocardium // Acta Cardiol. – 2006. – Vol. 61. – P. 21-27.

Резюме

**ПРИЧИННО-СЛЕДСТВЕННЫЕ
ОТНОШЕНИЯ В РЕМОДЕЛИРОВАНИИ
СЕРДЦА В УСЛОВИЯХ САХАРНОГО
ДИАБЕТА У КРЫС**

Баринов Е.Ф., Канана Н.М.

В экспериментах с моделированием аллоксанового диабета 46 крысам проведен анализ роли разных цепей рецепторно-мессенджерной системы клеток-мишеней в ремоделировании сердца. Сопоставления патохимических и макроскопических изменений сердца при условиях СД позволило обнаружить стадийность ремоделирования миокарда. В ранний срок ключевыми факторами в развитии гипертрофии желудочков сердца были повышения активности ПКА и ENOS-ГЦ. С конца 1 мес. развитие гипертрофии коррелировало с повышением чувствительности Аt1 рецепторов и активности ПКС. Сохранения гиперчувствительности Аt1 рецепторов наряду со снижением eNOS и ПКА при повышении активности ФДЕ играют решающую роль в инициирующей дилатационной кардиомиопатии через 3 месяца после моделирования аллоксанового диабета.

Ключевые слова: сахарный диабет, ремоделирование сердца, биохимические показатели

Summary

**REASONS AND CONSEQUENTS IN RAT
HEART REMODELING UNDER DIABETES
MELLITUS**

Barinov E.F., Kanana N.N.

In experiments on 46 rats with alloxan diabetes model the analysis of the role of different parts of receptors-messengers system of target cells in diabetic heart remodeling was performed. The interrelations between pathochemical and cardiac morphological changes were estimated to establish the steps of diabetic heart remodeling. Early hypertrophy was associated with activation of protein kinase A and eNOS-guanylyl cyclase system. Since the end of 1st month hypertrophy progress correlated with AT₁ receptors sensitivity increase and activation of protein kinase C. These changes together with eNOS and protein kinase A inhibition and phosphodiesterases stimulation led to initiation of heart ventriculi dilatation at 3 months after alloxan injection.

Keywords: saccharine diabetes, redesign of heart, biochemical indexes

*Впервые поступила в редакцию 22.08.2010 г.
Рекомендована к печати на заседании
редакционной коллегии после рецензирования*