

ВПЛИВ БЛОКАДИ КАЛЬЦІЄВИХ КАНАЛІВ L-ТИПУ НА ПАТЕРН ДИХАННЯ ТА ГАЗООБМІН ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ІНСУЛІНОРЕЗИСТЕНТНОСТІ У ЩУРІВ

Анотація

У дослідях на 24 щурах самцях проведено дослідження впливу блокади повільних кальцієвих каналів на дихання і газообмін при моделюванні інсулінорезистентності. Інсулінорезистентність модельовано за допомогою високожирової дієти (ВЖД) впродовж 2 тижнів. Повільні кальцієві канали блокувались верапамілом, який вводився інтраперитонеально в загальноприйнятій дозі 1 мг/кг маси тіла тварини. Дослідження паттерну дихання та газообміну проводились за допомогою установки, що включала в себе дихальну маску, пневмотахограф для малих лабораторних тварин та мас-спектрометр. Було виміряно частоту дихання (f) та дихальний об'єм (VT), обчислювали хвилинний об'єм дихання (V_E). За допомогою масспектрометра визначено кількість спожитого кисню (V_{O_2}) та виділеного вуглекислого газу (V_{CO_2}) за хвилину.

Показано, що при введенні блокатора повільних кальцієвих каналів спостерігається підвищення тонуусу бронхіол і стеновентиляторна перебудова дихання, без змін вірогідних змін енергетичного метаболізму. Виявлено, що застосування верапамілу в щурів із модельованою інсулінорезистентністю викликає підвищення бронхіального тонуусу, поглиблення стеновентиляторної перебудови дихання і зменшення доставки кисню в альвеоли легень, що супроводжується зниженням рівня енергетичного метаболізму.

Ключові слова: інсулінорезистентність; високожирова дієта; кальцієві канали L-типу; зовнішнє дихання; газообмін

Вступ

Інсулінорезистентність, як зменшення чутливості клітин до дії інсуліну, притаманна різноманітним метаболічним розладам, зокрема ожирінню, цукровому діабету II типу, часто виявляється при гіперглікемії та гіперліпідемії [1, 2]. При метаболічному синдромі, який супроводжується інсулінорезистентністю, жирова тканина не здатна ефективно регулювати накопичення жиру, внаслідок чого тригліцериди і вільні жирні кислоти залишаються циркулювати у кров'яному руслі [3]. Як наслідок може розвинутиися ліпотоксичний стан [4], оскільки такі жирні кислоти можуть активувати вроджену імунну відповідь із залученням внутрішньоклітинних сигнальних шляхів та стресу ендоплазматичного ретикулуму (ЕПР) в клітинах печінки, острівцевої частини підшлункової залози, серцевого м'язу, легень [3, 4]. За даними Mirrakhimov (2012) та Sagun (2015) ключовим фактором зниження легеневої вентиляції і обструкції легень при ЦД 2 типу є саме інсулінорезистентність [5, 6].

Блокада повільних кальцієвих каналів (БКК) може впливати на зовнішнє дихання через зміни у серцево-судинній системі та тонуусі бронхіального дерева [7, 8]. Протективні ефекти блокади повільних кальцієвих каналів (БКК) добре відомі у серцево-судинній системі при її ураженні та коморбідних патологіях [9]. Також є численні дослідження сприятливого впливу БКК на інші тканини і органи при їх пошкодженні із залученням кальцієвих механізмів, це стосується, зокрема, печінки [10, 11], сітківки ока [12], нирок [13] та ін. Проте, незважаючи на широке використання блокаторів Ca^{2+} -каналів L-типу в клінічній практиці, існують суперечливі дані щодо їх

впливу на вуглеводно-жировий метаболізм, інсулінорезистентність та газообмін і респірацію [3, 5, 6].

Таким чином, роль повільних кальцієвих каналів у перебудові зовнішнього дихання при метаболічних розладах на сьогодні є недостатньо дослідженою.

Метою нашої роботи було дослідити особливості впливу блокади повільних кальцієвих каналів на перебудову зовнішнього дихання при інсулінорезистентності у щурів.

Матеріали та методи

Дослідження були проведені на 24 щурах самців лінії Вістар, що утримувались на стандартному раціоні у стандартних умовах віварію з вільним доступом до води. Тварин було поділено на 4 групи: 1) «контроль» – інтактні тварини, яким за 15 хв перед забором органів інтраперитонеально вводили фізіологічний розчин; 2) «ВЖД» – тварини, в яких моделювали інсулінорезистентність; 3) «БКК» – тварини, яким проводили блокаду повільних кальцієвих каналів шляхом введення верапамілу; 4) БКК+ВЖД – тварини з модельованою інсулінорезистентністю, яким проводили блокаду повільних кальцієвих каналів.

Інсулінорезистентність моделювали [14, 15] за допомогою високожирової дієти (ВЖД) впродовж 2 тижнів. Блокатор кальцієвих каналів верапаміл (Дарниця, Україна) вводили інтраперитонеально в загальноприйнятій дозі 1 мг/кг маси тіла тварини [16].

Дослідження паттерну дихання та газообміну проводили за допомогою установки, що включала в себе дихальну маску, пневмотахограф для малих лабораторних тварин з датчиком тиску MPX5050 та мас-спектрометр МН6202, Україна. Вимірювали частоту дихання (f) та дихальний об'єм (V_T), обчислювали хвилинний об'єм дихання (V_E). За допомогою масспектрометра визначали кількість спожитого кисню (V_{O_2}) та виділеного вуглекислого газу (V_{CO_2}) за хвилину. Показники дихального обміну приводили в системі BTPS (температура тіла, тиск насиченого парами повітря), а показники газообміну – STPD (стандартна температура та тиск сухого повітря). Для усунення впливу циркадіанних коливань дихання і газообміну використовували референтну групу, яка перебувала в однакових умовах з дослідними групами, але не піддавалася дослідним впливам. При аналізі одержаних даних нормалізували одержані показники до показників референтної групи (контроль), які приймали за 100%.

Статистичний аналіз проводили за допомогою програми GraphPad Prism 8.0.3, застосовуючи метод 2-way ANOVA з поправкою Tukey. Статистично значущими вважали зміни при $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Зміни зовнішнього дихання у щурів із модельованою інсулінорезистентністю

У щурів з інсулінорезистентністю (група ВЖД) спостерігалась стеновентиляторна перебудова зовнішнього дихання [19]. При аналізі одержаних даних встановлено (**Табл. 1**), що показники цієї групи вірогідно не відрізнялися від контрольної групи, за винятком дихального коефіцієнту, який знижувався на 26 % порівняно з контрольною групою, за рахунок того, що об'єм спожитого кисню мав тенденції до зростання, водночас об'єм виділеного вуглекислого газу не знижувався вірогідно, що свідчить про активацію жирового обміну у щурів цієї групи [15].

Зміни показників зовнішнього дихання і газообміну за впливу блокатора кальцієвих каналів L-типу

За умов блокади повільних кальцієвих каналів спостерігали тенденцію до збільшення частоти дихання (на 10%) і вірогідне зниження дихального об'єму відносно контролю (на 21,5%, **Табл. 1**). Відповідно до цих змін хвилинний об'єм дихання мав тенденцію до зменшення відносно контролю на 12%, що свідчить про стеновентиляторну перебудову дихання в цій групі [14]. Об'єм спожитого кисню мав тенденцію до зниження (на 14%), в той час як виділення CO₂ вірогідно знижувалося в порівнянні з контролем на 32%. Як наслідок, дихальний коефіцієнт був вірогідно нижчим за контрольні значення на 20%, що може бути пов'язане з частковим переходом енергетичного метаболізму на використання ліпідних субстратів.

Альвеолярна вентиляція (V_A) знижувалась на 17% відносно контролю, вентиляційний еквівалент (VEq) не змінювався, як наслідок, співвідношення V_A/V_E також не зазнало змін (**Табл. 1**). Парціальний тиск кисню в альвеолах не відрізнявся від контролю, тоді як парціальний тиск CO₂ у альвеолах мав тенденцію до зниження на 19% відносно контролю. Кисневий ефект дихального циклу (VO_2/f) не зазнав змін. Екстракція O₂ не відрізнялась від контрольних значень, тоді як доставка O₂ мала тенденцію до зниження на 27%. Співвідношення тривалості видиху до загального часу дихального циклу (T_e/T_t) вірогідно зростало на 5%, тоді як співвідношення тривалості вдиху до тривалості видиху (T_i/T_e) – знижувалося на 10%. Пікові швидкості вдиху та видиху мали тенденцію до зниження на 15% та 41%, відповідно, середня швидкість вдиху та видиху – на 49% та 33%, відповідно.

Таким чином, під дією блокатора повільних кальцієвих каналів спостерігалось зниження ефективності функції зовнішнього дихання. Це може бути пов'язане із впливом БКК на тонус гладеньких м'язів бронхіального дерева, що узгоджується із даними літератури [7, 8].

Зовнішнє дихання і газообмін у інсулінорезистентних щурів під впливом БКК

При застосуванні блокатора кальцієвих каналів у щурів, які перебували на ВЖД, спостерігались наступні зміни зовнішнього дихання: f зростала на 15%, тоді як VT вірогідно знижувався на 43% відносно контролю і на 48% відносно групи ВЖД. Як наслідок це призводило до невірогідного зниження V_E порівняно із контролем (32%) та вірогідного зниження відносно групи ВЖД (49%). Зазначені зміни відповідали ефектам впливу верапамілу на контрольних щурів, але кількісно їх перевищували. Це свідчить, що на тлі інсулінорезистентності введення БКК викликає більш глибоку стеновентиляторну перебудову дихання.

Об'єм спожитого кисню мав тенденції до зниження відносно контролю (19%) і був вірогідно вищим відносно групи ВЖД (35%). У зв'язку з цим дихальний коефіцієнт вірогідно знижувався на 43% в порівнянні з контролем та на 13% відносно групи БКК. Альвеолярна вентиляція (V_A) мала тенденцію до зниження відносно контролю (32%) і вірогідно знижувалась відносно групи ВЖД (50%). Вентиляційний еквівалент незначно знижувався (на 11%), співвідношення V_a/V_e не змінювалося. Парціальний тиск кисню у альвеолах (P_{AO_2}) був дещо нижчим відносно контролю (11%), парціальний тиск вуглекислого газу (P_{ACO_2}) також мав тенденцію до зниження відносно контролю на 24%.

Екстракція O₂ мала тенденцію до зростання в порівнянні з контролем (32%), а доставка кисню – до зниження відносно контролю (32%) і вірогідно знижувалась відносно групи ВЖД (49%). Пікова швидкість вдиху мала тенденції до зростання на 14%, водночас середня швидкість вдиху невірогідно знижувалась на 41%. Пікова швидкість видиху зростала на 25% в порівнянні з контролем та достовірно зростала відносно групи БКК на 66%. Середня швидкість видиху була незначно вищою відносно

контролю на 15%. Зміни цих показників відрізнялися за своїм характером від впливу блокатора на контрольну групу.

Таким чином, зміни дихання і газообміну у інсулінорезистентних щурів під впливом БКК характеризувалися зростанням тонуусу бронхіол, що в подальшому призводило до підключення центральних механізмів регуляції дихання [18, 19], які викликають перебудову патерну дихання і зміну як часових показників дихання, так і швидкісних показників. Основним наслідком цього є порушення вентиляції альвеол, при якій в легенях з'являються зони з дуже високим і дуже низьким співвідношенням вентиляція/кровообіг, що в подальшому можуть бути основою для розвитку легеневої патології.

Таблиця 1

Показники зовнішнього дихання у щурів при інсулінорезистентності та введенні БКК, % від контролю (n=24, M±SD)

Показник	ВЖД	БКК	ВЖД+БКК	Ефект ВЖД	Ефект БКК	Взаємодія ВЖД і БКК
f	105,71±6,94	110,33±14,03	115,0±19,43	F=2,624 P=0,1335	F=0,7350 P=0,4096	F=0,007430 P=0,9329
VT/kg	105,38±9,0	78,46±8,01*	57,33±21,45*#	F=36,28 P<0,0001	F=1,858 P=0,2001	F=5,265 P=0,0424
V _E /kg	117,60±10,61	87,59±14,16	68,37±35,30#	F=11,25 P=0,0064	F=0,007772 P=0,9313	<i>F=4,012</i> <i>P=0,0704</i>
V _{O2} /kg	114,95±8,36	85,50±5,78	80,10±28,21#	F=13,01 P=0,0041	F=0,4860 P=0,5002	F=2,215 P=0,1647
V _{CO2} /kg	85,33±12,49	68,16±8,39*	46,62±19,02*#	F=36,05 P<0,0001	F=9,495 P=0,0104	F=0,3426 P=0,5701
RQ	74,09±9,00*	79,95±13,39*	57,22±3,64*+	F=17,13 P=0,0016	F=29,75 P=0,0002	F=0,1276 P=0,7277
V _A /kg	117,94±7,99	83,13±14,57	68,43±37,43#	F=12,32 P=0,0049	F=0,02933 P=0,8671	F=2,978 P=0,1123
V _A /V _E	100,38±4,57	94,57±5,28	98,89±2,84	F=3,003 P=0,1110	F=1,372 P=0,2662	F=0,9654 P=0,3469
P _A O ₂	100,68±4,34	97,99±9,44	88,85±21,03	F=1,609 P=0,2308	F=0,6022 P=0,4541	F=0,8111 P=0,3871
P _A CO ₂	72,86±3,81	80,39±6,38	75,55±31,23	F=1,080 P=0,3209	<i>F=3,858</i> <i>P=0,0753</i>	F=1,875 P=0,1982
VEq	103,20±16,0	102,45±21,33	87,09±39,01	F=0,3661 P=0,5574	F=0,2899 P=0,6010	F=0,6753 P=0,4287
V _{O2} /f	103,60±17,49	76,49±12,38	70,13±32,83	F=9,331 P=0,0110	F=0,02186 P=0,8851	F=0,2849 P=0,6041
Екстракція O ₂	97,92±13,28	105,67±26,70	131,52±59,44	F=1,609 P=0,2308	F=0,5894 P=0,4588	F=0,8139 P=0,3863
Доставка O ₂	117,93±8,0	83,13±14,56	68,43±37,43#	F=12,32 P=0,0049	F=0,02933 P=0,8671	F=2,978 P=0,1123
Ti/Te	106,03±6,11	90,70±3,08*	79,19±5,35*#+	F=67,08 P<0,0001	F=1,549 P=0,2391	F=15,81 P=0,0022
Te/Tt	96,72±3,28	105,45±2,13*	114,03±4,26*#+	F=63,96 P<0,0001	F=3,462 P=0,0897	F=17,35 P=0,0016
dV/dt вдику	104,18±12,44	88,19±10,35	84,02±22,85#	F=5,674 P=0,0364	F=7,470e-007 P=0,9993	F=0,3869 P=0,5466
dV/dt вдику	128,90±25,14	50,85±5,28	65,57±36,28#	F=9,256 P=0,0112	F=0,05200 P=0,8238	<i>F=4,553</i> <i>P=0,0562</i>
Пікова швидкість	81,05±38,61	84,53±36,74	113,90±16,92	F=0,3373 P=0,5731	F=0,1211 P=0,7345	F=2,607 P=0,1347

вдиху						
Середня швидкість вдиху	55,27±12,53	50,85±5,28	58,89±5,72	F=0,03319 P=0,8588	F=0,2217 P=0,6469	F=2,555 P=0,1383
Пікова швидкість видиху	81,49±43,03	58,91±26,85	124,68±4,70+	F=0,005741 P=0,9410	F=2,921 P=0,1155	F=9,291 P=0,0111
Середня швидкість видиху	79,25±42,78	66,63±32,43	115,07±4,94	F=0,007014 P=0,9348	F=0,8961 P=0,3642	F=5,593 P=0,0375

Примітка: *P<0,05 відносно контролю; #P<0,05 відносно групи ВЖД; +P<0,05 відносно групи БКК.

Висновки

1. При введенні блокаторів кальцієвих каналів спостерігається підвищення тонуусу бронхіол і стеновентиляторна перебудова дихання без вірогідного впливу на енергетичний метаболізм.
2. Застосування блокаторів кальцієвих каналів в умовах інсулінорезистентності викликає підвищення бронхіального тонуусу, поглиблення стеновентиляторної перебудови дихання і зменшення доставки кисню в альвеоли легень, що супроводжується зниженням рівня енергетичного метаболізму і переходом на вживання жирних субстратів.

Роботу виконано за цільовою програмою «Підтримка пріоритетних для держави наукових досліджень і науково-технічних (експериментальних) розробок відділення біохімії, фізіології і молекулярної біології НАН України за Постановою НАН України № 339 від 18.12.2019 (державний реєстраційний номер роботи 0120U001281) та підтримано коштами бюджетної програми «Науково-дослідні роботи молодих учених НАН України 2023-2024 рр.» за Розпорядженням Президії НАН України від 05.04.2023 №184, за проєктом «Молекулярні механізми розвитку інсулінорезистентності та перебудови енергетичного обміну при метаболічному синдромі».

Джерела

1. Galgani JE, Moro C, Ravussin E. Metabolic flexibility and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008 Nov;295(5):E1009-17.
2. Kitade H, Chen G, Ni Y, Ota T. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance: New Insights and Potential New Treatments. *Nutrients*. 2017 Apr 14;9(4):387.
3. Baffi CW, Wood L, Winnica D, Strollo PJ Jr, Gladwin MT, Que LG, Holguin F. Metabolic syndrome and the lung. *Chest*. 2016 Jun;149(6):1525-34.
4. Unger RH. Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology*. 2003 Dec;144(12):5159-65.
5. Sagun G, Gedik C, Ekiz E, Karagoz E, Takir M, Oguz A. The relation between insulin resistance and lung function: a cross sectional study. *BMC Pulm Med*. 2015 Nov 6;15:139.
6. Mirrakhimov AE. Chronic obstructive pulmonary disease and glucose metabolism: a bitter sweet symphony. *Cardiovasc Diabetol*. 2012 Oct 27;11:132.
7. Chapman RV. Effect of verapamil on ventilation and chemical control of breathing in anesthetized rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 1985 Dec;63(12):1608-11.
8. Seham Mustafa, Abdulkareem Abdulaheem, Abdulhakeem Alsughayer. Verapamil induces calcium influx in the trachea. *J Pharmacol Sci*. 2008 Apr;106(4):609-14
9. Nayler WG, Krikler D. Verapamil and the myocardium. *Postgrad Med J*. 1974 Jul;50(585):441-6.
10. Czaja MJ. A new mechanism of lipotoxicity: Calcium channel blockers as a treatment for nonalcoholic steatohepatitis? *Hepatology*. 2015 Jul;62(1):312-4.
11. Xu D, Wu Y, Liao ZX, Wang H. Protective effect of verapamil on multiple hepatotoxic factors-induced liver fibrosis in rats. *Pharmacol Res*. 2007 Apr;55(4):280-6
12. Wang Z, Wang D, Li Y, Zhang X. Protective effects of verapamil against h₂O₂-induced apoptosis in human lens epithelial cells. *Biomol Ther (Seoul)*. 2014 Nov;22(6):553-7.
13. Chen YS, Weng SJ, Chang SH, Li RY, Shane GT, Hsu JP, Yeh SW, Chang AC, Lee MJ. Evaluating the antidiabetic effects of R-verapamil in type 1 and type 2 diabetes mellitus mouse models. *PLoS One*. 2021 Aug 6;16(8):e0255405.
14. Tsapenko PK, Vasylenko MI, Aliiev RB, Zavgorodniy MO, Kozlovskaya M. G., Topchaniuk LY, Sydorenko AM, Bratus LV, Bakunovskiy OM, Portnichenko VI, Portnychenko AG. Effects of high-fat diet on the development of insulin resistance and metabolic syndrome in rats. *Ukr J Med Biol Sport* 2020, 5(3):441–44.
15. Portnychenko AG, Vasylenko MI, Aliiev RB, Kozlovskaya MG, Zavhorodnii MO, Tsapenko PK, Rozova KV, Portnichenko VI. The prerequisites for the development of type 2 diabetes or prediabetes in rats fed a high-fat diet. *Regul Mech Biosyst*. 2023;14(1):16-22.
16. Bosnjak ZJ, Marijic J, Roerig DL, Stowe DF, Murthy VS, Kampine JP. Chronic verapamil treatment depresses automaticity and contractility in isolated cardiac tissues. *Anesth Analg*. 1991 Apr;72(4):462-8.
17. Shields DL. Calcium channel blockers as initial therapeutic agents in hypertension: relationship to incident heart failure. *Biol Res Nurs*. 2014 Jul;16(3):266-77.
18. Breslav I. S. Breathing patterns: physiology, extremes conditions, and pathology / I. S. Breslav, Leningrad: Nauka. – 1984. – 205 p.
19. Fan G, Cui Y, Gollasch M, Kassmann M. Elementary calcium signaling in arterial smooth muscle. *Channels (Austin)*. 2019 Dec;13(1):505-519.