

БІОХІМІЧНІ МАРКЕРИ ВАСКУЛЯРНОЇ ДИСФУНКЦІЇ У САМИЦЬ ЩУРІВ ІЗ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2 ТИПУ ЗА УМОВ НОРМОТА ГІПОЕСТРОГЕНІЇ*

Боріков О. Ю.¹, Горбенко Н. І.¹, Іванова О. В.¹, Кіприч Т. В.¹, Таран К. В.¹,
Тржецинський С. Д.²

¹ ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», м. Харків;

² Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя

Borikov_A@mail.ru

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

АФК — активні форми кисню

ВЧТТГ — внутрішньочеревинний тест толерантності до глюкози

ЦД — цукровий діабет

НО-синтаза — синтаза оксиду нітрогену

Відомо, що ризик серцево-судинних захворювань у жінок репродуктивного віку достеменно нижчий у порівнянні з чоловіками — ефект, який пов'язують з протективною дією естрогенів. В той же час, наявність цукрового діабету (ЦД) не тільки знижує цей статевоспецифічний захист, але й призводить до підвищення частоти кардіоваскулярних катастроф у жінок у порівнянні з чоловіками того ж віку, які мають відповідну патологію [1]. Слід зазначити, що гендерні особливості розвитку діабетичних макросудинних ускладнень та роль статевих гормонів у цих процесах залишається мало з'ясованою та суперечливою.

Основним метаболічним порушенням, притаманним ЦД 1 та 2 типу, є гіперглікемія,

яка спричиняє цілу низку патологічних процесів, включаючи, посилене неферментативне глікозилювання білків, активацію поліолового та гексозамінового шляху обміну вуглеводів, розвиток оксидативного стресу, неспецифічну активацію протеїназних регуляторних шляхів та інше [2]. У комплексі, ці механізми, в значній мірі, визначають патогенез діабетичних мікро- та макросудинних ускладнень.

На сьогоднішній день не викликає сумнівів той факт, що ендотеліальна дисфункція, яка полягає в порушенні балансу між продукцією вазоконстрикторів і вазодилаторів, відіграє ключову роль у розвитку діабетичних макросудинних ускладнень [3].

Результати багаточисленних дослі-

*Роботу виконано згідно з плановою науковою тематикою лабораторії біохімічних досліджень ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України» «Визначення механізмів розвитку діабетичних серцево-судинних ускладнень при гіпоестрогенії та можливості корекції порушень за допомогою сполук із селективною естрогеноподібною активністю» (державний реєстраційний № 0113U001284). Установою, що фінансує дослідження, є НАМН України.

Автори гарантують колективну відповідальність за все, що опубліковано в статті.

Автори гарантують відсутність конфлікту інтересів та фінансової зацікавленості при виконанні роботи та написанні статті.

Рукопис надійшов до редакції 25.02.2015.

дження доводять наявність щільного зв'язку між ендотеліальною дисфункцією та оксидативним стресом. Слід зазначити, що основним джерелом утворення активних форм кисню (АФК) в ендотелії та клітинах гладеньких м'язів судин є мембрано-зв'язані НАД(Ф)Н-оксидази. За фізіологічних умов АФК, які генеруються НАД(Ф)Н-оксидазами у відповідь на зовнішні стимули, беруть участь у внутрішньоклітинному сигналіngu, наприклад, опосередковують вазоконстрикторний ефект ангіотензину II після активації його рецептора [4]. Проте, гіперпродукція АФК, що виникає в умовах ЦД 2 типу внаслідок хронічної гіперглікемії, призводить до розвитку оксидативного стресу та порушення роботи сигнальних шляхів, які контролюють тонус судин [5].

Одним з потужних вазорелаксантів, який, зокрема, дуже чутливий до порушення окисного гомеостазу, є оксид нітрогену (II). Останній утворюється у ендотелії та гладеньких м'язах судин за участю синтази оксиду нітрогену (NO-синтази). Звертає на себе увагу той факт, що провідним механізмом кардіопротекторного ефекту естрогенів вважається їх здатність підвищувати

синтез та біодоступність оксиду нітрогену. Так було встановлено, що естрогени підвищують рівень NO-синтази шляхом посилення експресії цього ферменту, а також стимулюють її активність за рахунок посттрансляційних модифікацій [6]. Також, естрогени можуть опосередковано підвищувати біодоступність оксиду нітрогену зменшуючи продукцію АФК НАД(Ф)Н-оксидазами в ендотелії судин та посилюючи синтез ферментів антиоксидантного захисту, включаючи екстрацелюлярну ізоформу супероксиддисмутази [7].

Серед інших компонентів антиоксидантного захисту, які можуть бути мішенню для регуляторної дії естрогенів у судинах, особливу роль відіграє гемоксигеназа [8]. Раніше було показано, що фармакологічна індукція гемоксигенази запобігає ураженню ендотелію та порушенню васкулярної функції у тварин із цукровим діабетом 2 типу [9].

Метою даної роботи було визначення порушень глюкозного та окисно-відновлювального гомеостазу, а також активності NO-синтази та гемоксигенази в судинах самиць щурів із нормо- та гіпоестрогенією за умов цукрового діабету 2 типу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В експерименті було використано 24 трьохмісячних самиці щурів популяції Вістар масою 180–220 г, яких утримували в стандартних умовах віварію.

Гіпоестрогенію відтворювали шляхом двосторонньої оваріектомії під легким ефірним наркозом. Цукровий діабет моделювали в два етапи. Інсулінорезистентність відтворювали через 2 тижні після хірургічного втручання в оваріектомованих щурів і щурів із інтактними яєчниками протягом десяти тижнів за допомогою висококалорійної дієти. Контрольні інтактні та контрольні оваріектомовані тварини протягом десяти тижнів отримували стандартну дієту віварію. На другому етапі, через чотири тижні після початку експерименту, моделювали відносну інсулінову недостатність. З цією метою щурам, які отримували висококалорійну дієту, вводили двічі внутрішньочерев-

но цитратний розчин стрептозотоцину в дозі 25 мг/кг маси тіла з інтервалом в один тиждень [10].

У кінці експерименту стан глюкозного гомеостазу оцінювали за показниками базальної глікемії та глікемії під час внутрішньочеревного тесту толерантності до глюкози (ВЧТТГ) (3 г на кг маси тіла).

Окисно-відновлювальний гомеостаз досліджували за рівнем дієнових кон'югатів та активності супероксиддисмутази в сироватці крові [11]. Систему вазодилатації характеризували за показниками активності NO-синтази та гемоксигенази в гомогенаті судин експериментальних тварин [12, 13]. Кількість білка в гомогенаті судин визначали за методом Лоурі [14]. Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням критерію Ст'юдента-Н'юмена-Кейлса [15].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що рівень базальної гіперглікемії у діабетичних щурів не залежить від забезпеченості естрогенами, оскільки не відмічалось вірогідної різниці в концентрації глюкози в крові натще в оварієктомованих тварин та самиць із інтактними яєчниками (табл. 1). Проте, динаміка глікемії та площа під глікемічними кривими, які були встановлені під час ВЧТТГ, дають підстави зробити висновок, що дефіцит естрогенів за умов розвитку ЦД 2 типу, сприяє зниженню чутливості периферичних тканин до інсуліну (див. табл. 1).

Відсутність статистично значущих відмінностей в рівні фруктозаміну, який є маркером довгострокових порушень глікемічного контролю, у групах оварієктомованих тварин та самиць з інтактними яєчниками із експериментальним діабетом, також може бути опосередкованим доказом того, що ендогенний рівень естрогенів не впливає на зниження функції β -клітин підшлункової залози, яка обумовлена специфічною цитотоксичною дією стрептозотоцину. Також слід зазначити, що у оварієктомованих тварин, які отримували стандартну дієту, всі дослідженні показники вуглеводного обміну статистично не відрізнялися від показників інтактних тварин. Останнє ще раз підтверджує результати інших досліджень, які свідчать про те, що наявність або відсутність

естрогенів безпосередньо не індукує метаболічні порушення, але може посилювати вплив інших негативних чинників. Аналіз даних, які характеризують глюкозний гомеостаз, дає змогу зробити висновок, що за умов дослідженої експериментальної моделі ЦД 2 типу рівень ендогенних естрогенів майже не впливає на порушення секреції інсуліну, індукованого введенням стрептозотоцину, але, в той же час, гіпоестрогенія сприяє розвитку інсулінорезистентності, яка, значною мірою, обумовлена висококалорійною дієтою.

На теперішній час оксидативний стрес розглядають у якості провідного патогенетичного механізму, що лежить в основі не тільки розвитку первинної інсулінорезистентності, а й всього широкого спектру діабетичних ускладнень, включаючи розвиток макроваскулярної патології. З іншого боку, одним з провідних механізмів вазопротекторного ефекту естрогенів вважається їх здатність підтримувати окисно-відновлювальний баланс у клітинах ендотелію [16].

За результатами дослідження було встановлено, що висококалорійна дієта у поєднанні з введенням стрептозотоцину призводить до порушення окисно-відновлювального гомеостазу в сироватці крові самиць щурів із інтактними яєчниками, про що свідчить збільшення вмісту дієнових кон'югатів

Т а б л и ц я 1

Вплив цукрового діабету 2 типу на показники глюкозного гомеостазу у самиць щурів за умов різної забезпеченості естрогенами, ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)

Група	n	Базальна глікемія, ммоль/л	Площа під глікемічною кривою під час ВЧТТГ, ммоль/л·хв	Концентрація фруктозаміну у сироватці крові, ммоль/л
Інтактний контроль	6	4,27 ± 0,20	982,9 ± 81,2	1,55 ± 0,06
Діабет	6	8,10 ± 0,25 ¹⁾	1306,3 ± 163,8 ¹⁾	2,49 ± 0,16 ¹⁾
Оварієктомія	6	3,89 ± 0,32 ²⁾	945,2 ± 10,4 ²⁾	1,37 ± 0,09 ²⁾
Оварієктомія + діабет	6	8,40 ± 0,42 ^{1), 3)}	1680,7 ± 45,4 ^{1), 2), 3)}	2,69 ± 0,39 ^{1), 3)}

П р и м і т к а. ¹⁾ — статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи «Інтактний контроль» ($p \leq 0,05$); ²⁾ — статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи «Діабет», ($p \leq 0,05$); ³⁾ — статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками групи «Оварієктомія», ($p \leq 0,05$).

та зниження активності супероксиддисмутази у сироватці крові у порівнянні з відповідними показниками для групи інтактних тварин (табл. 2). В той же час, було показано, що розвиток діабету на тлі гіпоестрогенії супроводжується більш виразним розвитком прооксидантного стану, про що свідчить збільшення рівня дієнових кон'югатів та зниження активності супероксиддисмутази не тільки у порівнянні з контрольною групою, але й у порівнянні з діабетичними тваринами з інтактними яєчниками (див. табл. 2).

Порушення ендотеліальної функції за умов розвитку оксидативного стресу, перш за все, пов'язане зі зниженням продукції та/або біодоступності оксиду нітрогену, який є не лише потужним вазодилататором, а й гальмує агрегацію тромбоцитів і проліферацію гладком'язових клітин судин. Серед можливих механізмів зниження продукції та/або біодоступності NO можна виділити: посилення інактивації NO з утворенням пероксинітриду в результаті реакції з супероксиданіоном; роз'єднання NO-синтазної активності за рахунок окислення її ко-фактора — тетрагідробіоптерину; гальмування позитивної регуляції активності NO-синтази або зниження її експресії [17]. Окрім того, розвиток інсулінорезистентності, безпосередньо, призводить до зниження синтезу оксиду нітрогену, оскільки гальмується інсулін-залежний сигнальний шлях, пов'язаний з активацією протеїнкінази Akt, яка фосфорилує та активує ендотеліальну NO-синтазу. Слід зазначити, що прямий позитивний вплив естрогенів стосовно NO-синтази (не-

геномний ефект) також реалізується за рахунок активації цього механізму [18].

Як було зазначено вище, в даному експерименті тварини з природним рівнем естрогенів за умов діабету зберігали більш високу чутливість до інсуліну та мали менш виразні показники оксидативного стресу в сироватці крові. В той же час, встановлено, що активність NO-синтази в гомогенаті судин діабетичних тварин знижувалась більш ніж на 30 % незалежно від наявності або відсутності естрогенів (табл. 3).

Останнє дозволяє припустити, що зниження активності NO-синтази в судинах за умов цукрового діабету безпосередньо пов'язано з розвитком гіперглікемії. Раніше було встановлено, що активація гексозамінового шляху, індукованого високим рівнем глюкози, призводить до посиленого глікозилування молекули NO-синтази по залишкам серину, зокрема, у позиції Ser1177, який є критичним для активації цього ферменту шляхом фосфорилування за участю протеїнкінази Akt [19].

Одним із ферментів антиоксидантного захисту, експресія якого підвищується у відповідь на розвиток оксидативного стресу в судинах, є гемоксигеназа. Існує велика кількість експериментальних доказів того, що активація гемоксигенази-1 у судинах запобігає розвитку гіпертензії, індукованої інсулінорезистентністю та гіперпродукцією АФК. Гемоксигеназа каталізує деградацію гема з утворенням заліза, оксиду вуглецю (II) та білівердину, який швидко перетворюється у білірубін. Кожен із цих продуктів може позитивно впливати

Т а б л и ц я 2

Вплив цукрового діабету 2 типу на показники окисно-відновлювального гомеостазу в сироватці крові в самиць щурів за умов різної забезпеченості естрогенами, ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)

Група	n	Рівень дієнових кон'югатів, мкмоль/л	Активність супероксиддисмутази, у. од./мкл
Інтактний контроль	6	1,79 ± 0,16	19,11 ± 1,50
Діабет	6	2,52 ± 0,16 ¹⁾	13,03 ± 1,40 ¹⁾
Оварієктомія	6	1,55 ± 0,20 ²⁾	18,16 ± 1,84 ²⁾
Оварієктомія + діабет	6	3,84 ± 0,25 ^{1), 2), 3)}	7,57 ± 0,94 ^{1), 2), 3)}

П р и м і т к а. ¹⁾, ²⁾, ³⁾ — як в табл. 1.

Вплив цукрового діабету 2 типу на стан системи обміну оксиду нітрогену та гемоксигеназну активність у судинах самиць шурів за умов різної забезпеченості естрогенами, $(\bar{X} \pm S_{\bar{X}})$

Група	n	Активність НО-синтази, нмоль/хв/мгбілка	Активність гемоксигенази, мкмоль/хв/мгбілка
Інтактний контроль	6	38,03 ± 2,61	34,64 ± 3,60
Діабет	6	25,34 ± 3,62 ¹⁾	68,25 ± 6,64 ¹⁾
Оварієктомія	6	42,45 ± 2,37 ²⁾	39,02 ± 5,30 ²⁾
Оварієктомія + діабет	6	22,47 ± 1,24 ^{1), 3)}	75,44 ± 7,26 ^{1), 3)}

Примітка. ¹⁾, ²⁾, ³⁾ як в табл. 1.

на ендотеліальну функцію. Так, білірубін може не тільки безпосередньо нейтралізувати супероксиданіон, але й також гальмувати його продукцію, знижуючи активність НАД(Ф)Н-оксидаз. Монооксид вуглецю, зв'язуючись із гуанілатциклазою, може ініціювати вазодилатацію в умовах зниження продукції та/або біодоступності оксиду нітрогену [20].

Показано, що активність гемоксигенази в гомогенаті судин за умов експериментального діабету однаково підвищується, як у самиць з інтактними яєчниками, так й у оварієктомованих тварин (див. табл. 3).

Як і у випадку NO-синтази, ключовим фактором, який визначає зміни активності гемоксигенази у діабетичних тварин, можна вважати гіперглікемію. Відомо, що кінцеві продукти посиленого глікозилювання,

утворення яких збільшується за умов гіперглікемії, активують низку адаптивних захисних реакцій, включаючи експресію гемоксигенази-1 в клітинах ендотелія, які спрямовані на мінімізацію ушкоджень судин [21].

Таким чином, аналізуючи отримані дані, можна дійти висновку, що розвиток кардіо-васкулярної патології за умов цукрового діабету, насамперед, визначається низкою метаболічних порушень, індукованих хронічною гіперглікемією. Наявність ендогенних естрогенів може дещо гальмувати розвиток інсулінорезистентності та посилювати антиоксидантний захист, проте ці позитивні ефекти виявляються недостатніми для попередження або послаблення прогресування ендотеліальної дисфункції.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що забезпеченість естрогенами не впливає на розвиток гіперглікемії за умов експериментального цукрового діабету 2 типу. В той же час, гіпоестрогенія сприяє зниженню чутливості до інсуліну в периферичних тканинах.
2. Діабет та тлі дефіциту естрогенів супроводжується більш виразним порушенням окисно-відновлювального балансу в сироватці крові, що може бути пов'язано зі зниженням антиоксидантного захисту, зокрема, активності супероксиддисмутази.
3. Спричинені діабетом зміни активності NO-синтази та гемоксигенази в гомогенаті судин, можуть бути наслідком некомпенсованої гіперглікемії, а їх виразність не залежить від наявності або відсутності естрогенів.

ЛІТЕРАТУРА
(REFERENCES)

1. Pilote L, Dasgupta K, Guru V, et al. *CMAJ* 2007; 176:31-44.
2. Xu RS. *World J Diabetes* 2015; 6:54-66.
3. Semenkovich CFJ. *Clin Invest* 2006; 116(7):1813-1822.
4. Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, et al. *Circ Res* 2002; 91(5):406-413.
5. Heistad DD. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(4):689-695.
6. Rahimian R, Chan L, Goel A, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322(2):373-379.
7. Strehlow K, Rotter S, Wassmann S. *Circ Res* 2003; 93(2):170-177.
8. Marcantoni E, Di Francesco L, Totani L, et al. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2012; 98:122-128.
9. Kruger AL, Peterson SJ, Schwartzman ML, et al. *J Pharm Exp Ther* 2006; 319:1144-1152.
10. Lin S, Yang J, Wu G, et al. *J Biomed Sci* 2010; 17(1):46-56.
11. Arutjunjan AV, Dubinina EE, Zybina NN. *Metody ochenki svobodnoradikal'nogo okislenija i antioksidantnoj sistemy organizma: metod. rekomendacii, Sankt-Peterburg*, 2000: 104 p.
12. Berger V, Gelger R, Hess J, et al. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(6):1493-1499.
13. Nowell S, Leakey J, Warren J, et al. *J Biol Chem* 1998; 273(50):33342-33346.
14. Lowry O, Rosenbrought N, Farr A. *J Biol Chem* 1951; 193(1):265-270.
15. Glans S. *Mediko-biologicheskaja statistika, Moskva*, 1998: 459 p.
16. Gorbenko NI. 100 izbrannyh lekcij po jendokrinologii, pod red. Karachenceva JuI, Kazakova AV, Kravchun NA, Il'inoj IM, *Har'kov*, 2009: 600-606.
17. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. *Physiol Rev* 2007; 87(1):315-424.
18. Kim KH, Bender JR. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 308:3-8.
19. Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, et al. *J Clin Invest* 2001; 108:1341-1348.
20. Kelsen S, Patel BJ, Parker LB, et al. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295(4):F1158-F1165.
21. He M, Siow RC, Sugden D, et al. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011; 21:277-285.

БІОХІМІЧНІ МАРКЕРИ ВАСКУЛЯРНОЇ ДИСФУНКЦІЇ У САМИЦЬ ЩУРІВ ІЗ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2 ТИПУ ЗА УМОВ НОРМО- ТА ГІПОЕСТРОГЕНІЇ

Боріков О. Ю.¹, Горбенко Н. І.¹, Іванова О. В., Кіприч Т. В.¹, Таран К. В.¹,
Тржецинський С. Д.²

¹ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», м. Харків;

²Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя

Vorikov_A@mail.ru

Досліджено вплив дефіциту естрогенів на біохімічні прояви васкулярної дисфункції, індукованої цукровим діабетом 2 типу, у самиць щурів. Встановлено, що гіпоестрогенія у поєднанні з діабетом сприяє більш виразному прояву інсулінорезистентності та посиленню окислювального стресу в сироватці крові. В той же час, рівень естрогенів не впливає на розвиток гіперглікемії та на зниження активності синтази оксиду нітрогену і гемоксигенази в судинах тварин з експериментальним діабетом.

К л ю ч о в і с л о в а: цукровий діабет 2 типу, естрогени, васкулярна дисфункція, синтаза оксиду нітрогену, гемоксигеназа.

БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ВАСКУЛЯРНОЙ ДИСФУНКЦИИ У САМОК КРЫС ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА НА ФОНЕ НОРМО- И ГИПОЭСТРОГЕНИИ

Бориков А. Ю.¹, Горбенко Н. И.¹, Иванова О. В.¹, Киприч Т. В.¹, Таран Е. В.¹,
Тржецинський С. Д.²

¹ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В. Я. Данилевского НАМН Украины»,
г. Харьков;

²Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье
Borikov_A@mail.ru

Изучено влияние дефицита эстрогенов на биохимические проявления васкулярной дисфункции, индуцированной сахарным диабетом 2 типа, у самок крыс. Установлено, что гипоестрогения в сочетании с диабетом способствует более выраженному проявлению инсулинорезистентности и усиливает оксидативный стресс в сыворотке крови. В то же время, уровень эстрогенов не влияет на развитие гипергликемии и на снижение активности синтазы оксида азота и гемоксигеназы в сосудах животных с экспериментальным диабетом.

К л ю ч е в ы е с л о в а: сахарный диабет 2 типа, эстрогены, васкулярная дисфункция, синтаза оксида азота, гемоксигеназа.

BIOCHEMICAL MARKERS OF VASCULAR DYSFUNCTION INDUCED BY TYPE 2 DIABETES IN FEMALE RATS WITH NORMO- OR HYPOESTROGENIC STATE

A. Y. Borikov¹, N. I. Gorbenko¹, O. V. Ivanova¹, T. V. Kiprich¹, K. V. Taran¹,
S. D. Trzhetsynskyi²

¹SI «V. Danilevsky Institute for Endocrine Pathology Problems of the NAMS of Ukraine», Kharkiv;

²Zaporozhye State Medical University
Borikov_A@mail.ru

The effect of estrogen deficiency on the biochemical parameters of vascular dysfunction induced by type 2 diabetes in female rats was investigated. It was shown that hypoestrogenic state in combination with diabetes promotes more expressive manifestation of insulin resistance and enhances oxidative stress in the blood serum. However, estrogens level does not influence on the hyperglycemia development and changes in activity of nitric oxide synthase and heme oxygenase in the vessels of diabetic animals.

K e y w o r d s: type 2 diabetes, estrogens, vascular dysfunction, nitric oxide synthase, heme oxygenase.