

# ПОРУШЕННЯ ОКИСНО-ВІДНОВЛЮВАЛЬНОГО ГОМЕОСТАЗУ В МІТОХОНДРІЯХ СЕРЦЯ ДІАБЕТИЧНИХ ЩУРІВ ІЗ ГІПОЕСТРОГЕНІЄЮ\*

Горбенко Н. І., Боріков О. Ю., Іванова О. В., Кіприч Т. В., Таран К. В.

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», м. Харків  
iper\_biochem@ukr.net

## ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

АФК — активні форми кисню	ЦД — цукровий діабет
ВЧТТГ — внутрішньочеревинний тест толерантності до глюкози	Mn-SOD — Mn-залежна супероксиддисмутаза
ГПО — глутатіонпероксидаза	NRF-1 — транскрипційний фактор 1 (nuclear respiratory factor 1)
ГР — глутатіонредуктаза	Tfam — основний транскрипційний фактор мтДНК.

Відомо, що ризик розвитку серцево-судинних захворювань у жінок репродуктивного віку значно нижчий у порівнянні з чоловіками, що обумовлено вазопротекторним ефектом естрогенів, тоді як втрата ендогенних естрогенів під час менопаузи у жінок асоціюється з негативним впливом на серцево-судинну систему та нівелює гендерні відмінності в частоті кардіоваскулярної патології [1].

В той же час цукровий діабет (ЦД) посилює атерогенну дію інших чинників ризику та знижує протективний ефект естрогенів, що призводить до диспропорційного зростання серцево-судинних катастроф у жінок

та чоловіків [2]. Так, смертність внаслідок ішемічної хвороби серця у жінок із діабетом підвищується в 2–5 рази, тоді як у чоловіків відмічається збільшення в 1–3 рази у порівнянні з особами без діабету [3].

Гендерні відмінності щодо негативного впливу ЦД обумовлені більш виразними проявами у жінок таких чинників кардіоваскулярного ризику, як ожиріння, гіпертонія, атерогенна дисліпідемія та прозапальний стан, що може бути пов'язано з нейтралізацією у них кардіо- та вазопротекторних ефектів ендогенних естрогенів [3].

На сьогодні мітохондріальна дисфункція розглядається як один із провідних па-

\*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 27.02.2015.

тогенетичних механізмів ЦД 2 типу, макро-судинних ускладнень та діабетичної кардіоміопатії. Відповідно до «мітохондріальної гіпотези старіння» в основі вікових та кардіоваскулярних порушень лежить зниження продукції енергії мітохондріями, посилення оксидативного стресу і прискорений апоптоз клітин [4].

Наявність рецепторів до естрогенів в мітохондріях кардіоміоцитів та клітин ендотелію відіграє важливу роль в регулюванні гормоном мітохондріальної функції та продукції вільних радикалів. Дослідження останнього десятиріччя довели, що мітохондріальна функція може бути мішенню для регуляторного ефекту естрогенів у багатьох

типах клітин та тканин, який реалізується за рахунок кооперативної дії рецепторів естрогенів та їх ко-активаторів як у ядерному, так і у мітохондріальному геномі [5]. Взаємодіючи з рецепторами в мітохондріях, естрогени підвищують продукцію АТФ і знижують оксидативний стрес та апоптоз в кардіоміоцитах та ендотеліальних клітинах, що може сприяти профілактиці серцево-судинних захворювань та збільшенню тривалості життя жінок [6].

Метою даної роботи було визначення порушень окисно-відновлювального гомеостазу у мітохондріях серця щурів із нормо- та гіпоестрогенією за умов цукрового діабету 2 типу.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проводилися відповідно до національних «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), що відповідають положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985). В експерименті були використані 24 тримісячні самиці щурів популяції Вістар масою 180–220 г, яких утримували в стандартних умовах віварію.

Гіпоестрогенію відтворювали шляхом двосторонньої оваріектомії під легким ефірним наркозом [7]. 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, яка складалася із 15 % жиру, 25 % сахарози, 1 % жовчних кислот та 56,5 % стандартної їжі [8]. 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 внутрішньочеревно цитратний розчин стрептозотцину в дозі 25 мг/кг маси тіла з інтервалом в один тиждень. Контрольні тварини за ана-

логічною схемою отримували внутрішньочеревно цитратний буфер [8].

Усі експериментальні тварини були розподілені на наступні групи:

- інтактний контроль;
- діабет;
- гіпоестрогенія;
- гіпоестрогенія + діабет.

У кінці експерименту стан глюкозного гомеостазу оцінювали за показниками базальної глікемії та глікемії під час внутрішньочеревинного тесту толерантності до глюкози (ВЧТТГ) (3 г на кг маси тіла). Вміст глюкози у крові визначали глюкозооксидазним методом за допомогою ферментативного аналізатора глюкози «Ексан-Г». Коефіцієнт чутливості до інсуліну оцінювали під час короткого інсулінового тесту (0,5 Од/кг маси тіла) [9].

Мітохондрії серця щурів отримували методом диференційного центрифугування при 7000g в середовищі, яке містило 10 мМ Трис-НСІ буфера рН 7.4, 250 мМ цукрози, 10 мМ етилендіамінтетраацетату та 0,5 % бичачий сироватковий альбумін [10]. Кількість білка в суспензії мітохондрій визначали за методом Лоурі [11].

Інтенсивність продукції активних форм кисню (АФК) під час інкубації у середовищі з субстратами окислення (піруват та сукцинат), АДФ та екзогенною супероксиддисмутазою визначали за кількістю утворе-

ного пероксиду водню [12]. Стан ферментативної ланки антиоксидантного захисту визначали за активністю Mn-залежної супероксиддисмутази (Mn-SOD), глутатіонпероксидази (ГПО) та глутатіонредуктази (ГР) в мітохондріях серця [12].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили методами варіаційної статистики. Визначення характеру розподілу

ознаки в виборці здійснювали за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Для множинних порівнянь даних з нормальним розподілом проводили параметричний однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA та застосовували метод Ст'юдента-Н'юмена-Кейлса. Розходження вважали статистично значущим при ( $p < 0,05$ ) [13].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В результаті проведених досліджень розвиток ЦД 2 типу було верифіковано як у тварин з інтактними яєчниками, так і в оваріектомованих щурів, що підтверджувалося наявністю базальної гіперглікемії та більш високими показниками площини під глікемічними кривими під час ВЧТТГ, а також зниженням коефіцієнта чутливості до інсуліну відносно показників, що спостерігали у контрольних тварин (табл. 1).

Відповідно до сучасної гіпотези оксидативного стресу, як патогенетичного механізму різних хронічних захворювань, включаючи ЦД 2 типу, саме порушення мітохондріальних редокс-сигнальних шляхів, які регулюють баланс між накопиченням і утилізацією енергії, є основною причиною розвитку метаболічних змін, що призводять в кінцевому рахунку до зниження чутливості до інсуліну, а також до прогресування супутніх

патологій, зокрема діабетичної кардіоміопатії [14, 15].

Встановлено, що цукровий діабет призводить до зростання продукції АФК, які утворюються у процесі окисного фосфорилювання в ізольованих мітохондріях серця щурів, на 40 % порівняно з інтактним контролем (табл. 2). В той же час, поєднання діабету з дефіцитом естрогенів спричиняло більш виразні порушення мітохондріальної функції, про що свідчило подальше підвищення АФК (див. табл. 2).

Відомо, що вплив естрогенів на синтез компонентів дихального ланцюга мітохондрій, ферментів окисного метаболізму та антиоксидантного захисту, які кодується у ядерному геномі, реалізується за рахунок підвищення експресії транскрипційного фактору NRF-1 (nuclear respiratory factor 1) [16]. Останній також є активато-

Таблиця 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	Коефіцієнт чутливості до інсуліну, %
Інтактний контроль	6	4,27 ± 0,20	982,9 ± 81,2	32,92 ± 1,15
Діабет	6	8,10 ± 0,25 <sup>1)</sup>	1306,3 ± 163,8 <sup>1)</sup>	22,81 ± 0,91 <sup>1)</sup>
Дефіцит естрогенів	6	3,89 ± 0,32 <sup>2)</sup>	945,2 ± 10,4 <sup>2)</sup>	31,29 ± 1,29 <sup>2)</sup>
Дефіцит естрогенів + діабет	6	8,40 ± 0,42 <sup>1), 3)</sup>	1680,7 ± 45,4 <sup>1), 2), 3)</sup>	13,02 ± 0,74 <sup>1), 2), 3)</sup>

Примітка. <sup>1)</sup> — статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи «Інтактний контроль» ( $p \leq 0,05$ ); <sup>2)</sup> — статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи «Діабет» ( $p \leq 0,05$ ); <sup>3)</sup> — статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи «Дефіцит естрогенів» ( $p \leq 0,05$ ).

Вплив цукрового діабету 2 типу на інтенсивність продукції активних форм кисню та активність ферментів антиоксидантного захисту в ізольованих мітохондріях серця самиць щурів за умов різної забезпеченості естрогенами, ( $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ )

Група	n	Інтенсивність продукції АФК, нмоль Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> /хв/мг білка	Активність ферментів		
			Мп-СОД, у. о./мг білка	ГПО, мкмоль/хв /мг білка	ГР, мкмоль/хв /мг білка
Інтактний контроль	6	0,295 ± 0,015	45,28 ± 3,75	18,06 ± 2,28	11,25 ± 0,54
Діабет	6	0,484 ± 0,049 <sup>1)</sup>	25,76 ± 2,61 <sup>1)</sup>	16,33 ± 1,88	7,74 ± 0,26 <sup>1)</sup>
Дефіцит естрогенів	6	0,318 ± 0,035 <sup>2)</sup>	35,36 ± 1,96 <sup>1), 2)</sup>	19,32 ± 1,96	8,12 ± 0,65 <sup>1)</sup>
Дефіцит естрогенів + діабет	6	0,609 ± 0,028 <sup>1), 2), 3)</sup>	29,85 ± 1,41 <sup>1), 3)</sup>	15,00 ± 2,09	7,69 ± 0,59 <sup>1)</sup>

Примітка. <sup>1)</sup> — статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи «Інтактний контроль» ( $p \leq 0,05$ ); <sup>2)</sup> — статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи «Діабет» ( $p \leq 0,05$ ); <sup>3)</sup> — статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи «Дефіцит естрогенів» ( $p \leq 0,05$ ); АФК — активні форми кисню; Мп-СОД — Мп-залежна супероксиддисмутаза; ГПО — глутатіонпероксидаза; ГР — глутатіонредуктаза.

ром основного транскрипційного фактору мтДНК — Tfam, який забезпечує експресію мітохондріальних генів [17]. Таким чином, антиоксидантний ефект естрогенів може бути реалізований за рахунок активації NRF-1 та Tfam у ядерному геномі, збільшення синтезу всіх компонентів мітохондрій, що попереджає розвиток мітохондріальної дисфункції, сприяє підвищенню окисної ємності та зменшенню продукції активних форм кисню.

Оскільки оксидативний стрес визначається як дисбаланс між продукцією та утилізацією АФК, являло інтерес визначення активності антиоксидантної системи захисту в мітохондріях серця самиць щурів за умов ЦД 2 типу, гіпоестрогенії та їх сполучення.

Встановлено, що як діабет, так і гіпоестрогенія призводять до достовірного зниження активності таких антиоксидантних ферментів, як Мп-СОД та ГР. В той же час, слід зазначити, що діабетичний стан пригнічує антиоксидантну систему мітохондрій серця в більшій мірі, ніж дефіцит естрогенів. Проте, за умов поєднання діабету та гіпоестрогенії не спостерігали адитивності впливу цих негативних факторів на активність вказаних ферментів антиоксидантного захисту в мітохондріях серця. При визна-

ченні активності іншого мітохондріального ферменту — глутатіонпероксидази не було виявлено суттєвих відмінностей в усіх експериментальних групах (див. табл. 2).

Зниження активності антиоксидантних ферментів в мітохондріях серця за умов гіпоестрогенії може бути обумовлено тим, що естрогени відіграють важливу роль в моделюванні експресії вищезазначених ензимів, зокрема супероксиддисмутази [18]. Окрім того, посилення продукції АФК в мітохондріях серця оваріектомованих щурів, ймовірно, є наслідком порушення мітохондріальної функції, яка регулюється естрогенами [19].

В той же час, метаболічні зсуви, обумовленні цукровим діабетом, призводять до більш виразних деструктивних змін у окисно-відновлювальному гомеостазі мітохондрій в порівнянні з гіпоестрогенією, що може пояснити відсутність адитивності негативного впливу вищезазначених чинників.

Таким чином, порушення окисно-відновлювального балансу в мітохондріях серця можна розглядати в якості перспективної фармакологічної мішені як для профілактики ЦД 2 типу, так і для корекції його макросудинних ускладнень у жінок в постменопаузальному віці [20].

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що як дефіцит естрогенів, так і ЦД 2 типу призводять до розвитку оксидативного стресу в мітохондріях кардіоміоцитів шляхом посилення продукції активних форм кисню та зниження активності антиоксидантних ферментів — супероксиддисмутази та глутатіонредуктази.
2. Діабетичний стан пригнічує антиоксидантну систему мітохондрій серця в більшій мірі, ніж дефіцит естрогенів.
3. Сполучення цукрового діабету 2 типу з гіпоестрогенією спричиняє адитивний стимулюючий вплив на продукцію активних форм кисню, проте, не посилює негативного ефекту діабетичного стану на антиоксидантну систему захисту в мітохондріях серця.

## ЛІТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Rivellese AA, Riccardi G, Vaccaro O. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010; 20(6):474-480.
2. Leosdottir M, Willenheimer R, Persson M, Nilsson PM. *Cardiovasc Diabetol* 2011; 10:118.
3. Alka M, Kanaya M, Grady D, Barrett-Connor E. *Arch Intern Med* 2002; 162(15):1737-1745.
4. Sack MN. *Mol Cell Cardiol* 2009; 46(6):842-849.
5. Duckles SP, Krause DN, Stirone C, Procaccio V. *Mol Interv* 2006; 6(1):26-35.
6. Stirone C, Duckles SP, Krause DN, Procaccio V. *Mol Pharmacol* 2005; 68(4):959-965.
7. Zapadnjuk IP, Zapadnjuk VJu, Zaharija EA. *Laboratornye zhivotnye, ih razvedenie, sodержanie i ispol'zovanie v jeksperimente, Kiev*, 1962: 253 p.
8. Lin S, Yang J, Wu G, et al. *J Biomed Sci* 2010; 17(1):46-56.
9. Akinmokun A, et al. *Diabet Med* 1992; 9(4):432-437.
10. Chans B. *Reguljacija kletocnogo obmena, Moskva*, 1962: 111 p.
11. Lowry O, Rosenbrought N, Farr A. *J Biol Chem* 1951; 193(1):265-270.
12. Arutjunjan AV, Dubinina EE, Zybina NN. *Metody ocenki svobodnoradikal'nogo okislenija i antioksidantnoj sistemy organizma: metod. rekomendacii, Sankt-Peterburg*, 2000: 104 p.
13. Glans S. *Mediko-biologicheskaja statistika, Moskva*, 1998: 459 p.
14. Sena LA, Chandel NS. *Mol Cell* 2012; 48(2):158-167.
15. Hulsmans M, Dooren EV, Holvoet P. *Curr Atheroscler Rep* 2012; 14(3):264-276.
16. Mattingly KA, Ivanova MM, Riggs KA, et al. *Mol Endocrinol* 2008; 22(3):609-622.
17. Scarpulla RCJ. *Cell Biochem* 2006; 97(4):673-683.
18. Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, et al. *Circ Res* 2003; 93(2):170-177.
19. Dubey RK, Jakson EK. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280:F365-F388.
20. Boudina S, Abel ED. *Circulation* 2007; 115(25):3213-3223.

## ПОРУШЕННЯ ОКИСНО-ВІДНОВЛЮВАЛЬНОГО ГОМЕОСТАЗУ В МИТОХОНДРІЯХ СЕРЦЯ ДІАБЕТИЧНИХ ЩУРІВ ІЗ ГІПОЕСТРОГЕНІЄЮ

Горбенко Н. І., Боріков О. Ю., Іванова О. В., Кіпріч Т. В., Таран К. В.

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», м. Харків  
*iprep\_biochem@ukr.net*

Визначено роль дефіциту естрогенів, цукрового діабету 2 типу та їх сполучення в розвитку порушень окисно-відновлювального гомеостазу в мітохондріях серця експериментальних щурів. Встановлено, що як дефіцит естрогенів, так і цукрового діабету 2 типу призводить до розвитку оксидативного стресу в мітохондріях кардіомиоцитів шляхом посилення продукції активних форм кисню та зниження активності антиоксидантних ферментів — супероксиддисмутази та глутатіонредуктази, причому діабетичний стан пригнічує антиоксидантну систему мітохондрій серця в більшій мірі, ніж гіпоестрогенія. Сполучення цукрового діабету 2 типу з дефіцитом естрогенів спричиняє адитивний стимулюючий вплив на продукцію активних форм кисню, проте, не посилює негативного ефекту діабетичного стану на антиоксидантну систему захисту в мітохондріях серця.

К л ю ч о в і с л о в а: цукровий діабет, дефіцит естрогенів, мітохондрії серця, оксидативний стрес.

## НАРУШЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ГОМЕОСТАЗА В МИТОХОНДРИЯХ СЕРДЦА ДИАБЕТИЧЕСКИХ КРЫС С ГИПОЭСТРОГЕНИЕЙ

Горбенко Н. И., Бориков А. Ю., Иванова О. В., Киприч Т. В., Таран К. В.

ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В. Я. Данилевского НАМН Украины»,  
г. Харьков  
*iprep\_biochem@ukr.net*

Изучена роль дефицита эстрогенов, сахарного диабета 2 типа и их сочетания в развитии нарушений окислительно-восстановительного гомеостаза в митохондриях сердца экспериментальных крыс. Установлено, что как дефицит эстрогенов, так и сахарного диабета 2 типа приводит к развитию оксидативного стресса в митохондриях кардиомиоцитов, усиливая продукцию активных форм кислорода и снижая активность антиоксидантных ферментов — супероксиддисмутазы и глутатионредуктазы, причем диабетическое состояние угнетает антиоксидантную систему митохондрий сердца в большей степени, чем гипоестрогения. Сочетание сахарного диабета 2 типа с дефицитом эстрогенов вызывает аддитивное стимулирующее влияние на продукцию активных форм кислорода, однако, не усиливает негативного эффекта диабета на антиоксидантную систему защиты в митохондриях сердца.

К л ю ч е в ы е с л о в а: сахарный диабет, дефицит эстрогенов, митохондрии сердца, оксидативный стресс.

## THE DISTURBANCE OF OXIDATION-REDUCTION HOMEOSTASIS IN THE HEART MITOCHONDRIA OF DIABETIC RAT WITH ESTROGEN DEFICIENCY

N. Gorbenko, A. Borikov, O. Ivanova, T. Kiprich, K. Taran

SI «V. Danilevsky Institute for Endocrine Pathology Problems of the NAMS of Ukraine», Kharkiv  
*iprep\_biochem@ukr.net*

It was investigated the role of estrogen deficiency, type 2 diabetes and their combination in oxidation-reduction homeostasis of the heart mitochondria in experimental rats. It was established that estrogen deficiency and type 2 diabetes leads to oxidative stress in the mitochondria of cardiomyocytes increasing the reactive oxygen species production and reducing the activity of antioxidant enzymes — superoxide dismutase and glutathione, wherein the diabetic condition inhibits the mitochondrial antioxidant system of the heart more than estrogen deficiency. The combination of type 2 diabetes with estrogen deficiency causes additive stimulatory effect on reactive oxygen species production, however, does not increase the negative effects of diabetes on the antioxidant defense system in the heart mitochondria.

К e y w o r d s: diabetes, estrogen deficiency, heart mitochondria, oxidative stress.