

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ВПЛИВ ЕКЗОГЕННОГО 17 β -ЕСТРАДІОЛУ НА АКТИВНІСТЬ ГЕМОКСИГЕНАЗИ ТА ВМІСТ ТБК-АКТИВНИХ ПРОДУКТІВ У СУДИНАХ ОВАРІЕКТОМОВАНИХ ЩУРІВ ІЗ ІНСУЛІНОРЕЗИСТЕНТНІСТЮ

Кіприч Т. В., Нікітченко І. В.¹, Горбенко Н. І.

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

¹Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна

Інсулінорезистентність — це метаболічне порушення, що полягає в основі цукрового діабету 2 типу та відіграє важливу роль у розвитку таких факторів кардіоваскулярного ризику, як дисліпідемія, ендотеліальна дисфункція, ожиріння [1]. Сьогодні отримано вагомі докази того, що головним чинником інсулінорезистентності та інших провідних факторів ризику серцево-судинних захворювань (ендотеліальної дисфункції, протромбічного та прозапального станів) є оксидативний стрес, що розвивається внаслідок порушення балансу між продукцією та ін активацією активних форм кисню [2].

Дефіцит естрогенів вважають незалежним фактором ризику кардіальної патології у жінок в постменопаузальному періоді. Зміни гормонального профілю супроводжуються дисрегуляцією обмінних процесів та розвитком прозапального стану, порушень гемостазу, ендотеліальної дисфункції, інсулінорезистентності [3]. Період менопаузи характеризують значним зниженням, насамперед, рівня естрадіолу. За даними досліджень останніх років, цей гормон виказує вазопротекторні ефекти і здатен поліпшувати ліпідний профіль, регулювати рівні гемоста-

тичних факторів, глюкози, інсуліну та ендотеліальних факторів, пригнічувати оксидативний стрес [4].

Останнім часом особливу увагу дослідників привертає фермент гемоксигеназа, який вважають важливим медіатором протективної дії естрадіолу на тканинному рівні. Гемоксигеназа каталізує перший швидкість-лімітуючий етап окислювального розщеплення гему з утворенням монооксиду вуглецю, білівердину та іонів заліза. Продукти гемоксигеназної реакції є біологічно активними сполуками та беруть участь у захисних реакціях за умов порушення окислювально-відновлювального стану [5]. Оскільки гемоксигеназа відіграє важливу роль у збереженні функціонального стану судинної стінки, регулювання її активності може бути одним із перспективних напрямків профілактики та лікування ендотеліальної дисфункції.

Метою роботи, що подається, було визначення впливу екзогенного 17 β -естрадіолу на активність гемоксигенази та вміст ТБК-активних продуктів в судинах оваріектомованих щурів із інсулінорезистентністю.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Гіпоестрогенію у тримісячних щурів відтворювали шляхом двосторонньої оваріектомії під легким ефірним наркозом [6]. Підтвердженням естрогендефіцитного ста-

ну в експериментальних тварин було майже чотириразове зниження маси матки після двосторонньої оваріектомії.

Через два тижні після хірургічного

втручання розпочинали індукцію синдрому інсулінорезистентності хронічним (протягом двох місяців) введенням фруктози з питною водою у концентрації 200 г/л [7]. Дієту, на якій утримували тварин, не змінювали.

17 β -естрадіол у дозі 0,2 мг/кг маси тіла вводили перорально за допомогою зонду один раз на добу протягом восьми тижнів, починаючи з першого дня експерименту [8].

Стан глюкозного гомеостазу оцінювали за показниками базальної глікемії, під час внутрішньочеревинного тесту толерантності до глюкози (ВЧТТГ) (3 г на кг маси тіла) та за рівнем фруктозаміну в сироватці крові [9]. Чутливість до інсуліну визначали за допомогою внутрішньочеревинного тесту толерантності до інсуліну (ВЧТТІ) (інсулін — 0,5 Од/кг маси тіла, глюкоза — 2 г/кг через 10 хв. після введення інсуліну) [10]. Вміст

глюкози у крові визначали глюкозооксидазним методом за допомогою ферментативного аналізатора глюкози «Ексан-Г».

Для отримання гомогенату судин використовували дугу аорти (*arcus aortae*) та спинну аорту (*aorta dorsalis*).

Гемоксигеназну активність вимірювали спектрофотометрично за поглинанням білірубину [11]. Вміст продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) в гомогенаті судин визначали за реакцію з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) [12].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили методами варіаційної статистики. Для визначення характеру розподілу даних використовували критерій Шапиро-Уїлка. Для нормального розподілу проводили дисперсійний аналіз ANOVA [13]. Дані наведені як $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В результаті проведеного дослідження встановлено, що 8-тижневе утримання тварин на високофруктозній дієті не впливало на рівень глікемії натще в жодній з експериментальних груп. В той же час, при проведенні ВЧТТГ та ВЧТТІ було виявлено розвиток інтолерантності до вуглеводів та зниження чутливості до інсуліну в оварієктомованих щурів, які отримували фруктозу та плацебо, що підтверджувалося більш високими показниками площини під відповідними глікемічними кривими (ППК) у порівнянні з контрольною групою (табл. 1.).

Порушення глюкозного гомеостазу також підтверджувалося підвищенням рівня фруктозаміну в сироватці крові оварієктомованих тварин, які отримували плацебо (див. табл. 1.). Зростання концентрації фруктозаміну може бути наслідком безпосереднього посилення початкових реакцій неферментативного глікозилювання за умов хронічного надходження високих доз фруктози. Підвищене накопичення продуктів раннього глікозилювання індукує різні порушення в судинах, включаючи захоплення і модифікацію ліпопротеїнів низької густини (ЛПНГ), що провокує імунну відповідь. Існування антитіл до глікозилюваних ЛПНГ призводить до утворення імунних comple-

ксів, які впливають на секрецію цитокінів, коагуляційну активність, проникність судин та експресію судинних факторів росту [14]. Крім того, глікозилювані білки можуть автоокислюватися, генеруючи вільні радикали, які посилюють процеси неферментативного приєднання глюкози до макромолекул та індукують подальші судинні порушення.

Слід зазначити, що дефіцит естрогенів без поєднання з високофруктозною дієтою не призводив до розвитку інсулінорезистентності, інтолерантності до вуглеводів та змін у рівні фруктозаміну (див. табл. 1). Отримані дані співпадають з результатами досліджень [15, 16], в яких дефіцит естрогенів супроводжувався зниженням чутливості до інсуліну лише в поєднанні з високовуглеводним або високожировим навантаженням.

Восьмитижневе пероральне введення 17 β -естрадіолу оварієктомованим тваринам гальмувало розвиток інсулінорезистентності та інтолерантності до глюкози, підтвердженням чому було суттєве зменшення ППК під час ВЧТТГ і ВЧТТІ та незмінний рівень фруктозаміну порівняно з показниками групи, що отримувала плацебо (див. табл. 1.).

При визначенні інтенсивності ПОЛ було встановлено, що високофруктозна діє-

Показники глюкозного гомеостазу в оварієктомованих щурів із інсулінорезистентністю, індукованою високофруктозною дієтою (n = 6)

Група	Базальна глікемія, ммоль/л	Концентрація фруктозаміну, ммоль/л	ППК під час ВЧТГ, ммоль/л·хв.	ППК під час ВЧТГ, ммоль/л·хв.
Інтактний контроль	4,30 ± 0,16	1,64 ± 0,20	560,5 ± 39,2	373,6 ± 27,8
Оварієктомія	4,58 ± 0,21	1,55 ± 0,21	540,2 ± 31,6	427,8 ± 28,1
Оварієктомія + ВФД + плацебо	4,33 ± 0,17	2,20 ± 0,19*	719,5 ± 37,2*	536,1 ± 31,3*
Оварієктомія + ВФД + 17β-естрадіол	4,31 ± 0,23	1,64 ± 0,18 ^Δ	484,6 ± 22,4 ^Δ	399,47 ± 15,7 ^Δ

Примітка. * — статистично значуща різниця з даними групи «інтактний контроль», $p \leq 0,05$; ^Δ — статистично значуща різниця з даними групи «оварієктомія + ВФД + плацебо», $p \leq 0,05$.

Таблиця 2

Вміст ТБК-активних продуктів у гомогенаті судин оварієктомованих щурів із інсулінорезистентністю, індукованою високофруктозною дієтою (n = 6)

Група	Вміст ТБК-активних продуктів в гомогенатах тканин, нмоль/мг білка
Інтактний контроль	0,36 ± 0,04
Оварієктомія	0,37 ± 0,13
Оварієктомія + ВФД + плацебо	0,92 ± 0,17 ^{*,**}
Оварієктомія + ВФД + 17β-естрадіол	0,33 ± 0,10 ^Δ

Примітка. * — статистично значуща різниця з даними групи «інтактний контроль», $p \leq 0,05$; ** — статистично значуща різниця з даними групи «оварієктомія», $p \leq 0,05$; ^Δ — статистично значуща різниця з даними групи «оварієктомія + ВФД + плацебо», $p \leq 0,05$.

та призводить до підвищення рівня ТБК-активних продуктів в тканинах судин оварієктомованих щурів (табл. 2). Оскільки в даній групі тварин ми відзначали порушення чутливості до інсуліну та зростання концентрації фруктозаміну, розвиток оксидативного стресу, що спостерігався, може бути обумовлений як метаболічним дисбалансом, пов'язаним з інсулінорезистентністю, так і інтенсифікацією процесів неферментативного глікозилювання.

Зниження концентрації ТБК-активних продуктів в тканинах судин, яке спостерігалось після введення 17β-естрадіолу (див. табл. 2), можна пояснити прямим антиоксидантним ефектом гормону та його опосередкованим впливом на окислювально-відновлювальні процеси через поліпшення вуглеводного обміну.

У свою чергу, підвищення рівня актив-

них форм кисню та сполук, що їх генерують, є одним із патофізіологічних стимулів, що індукують фермент гемоксигеназу-1, який називають маркером оксидативного стресу. В результаті проведеного дослідження ми виявили суттєве підвищення активності гемоксигенази в тканинах судин оварієктомованих щурів з інсулінорезистентністю, якому запобігало екзогенне введення 17β-естрадіолу (табл. 3).

Збільшення активності ферменту в судинах може відбуватися не тільки внаслідок інтенсифікації ПОЛ, але й за рахунок підвищеного рівня постпрандіальної глікемії за умов інсулінорезистентності. Відомо, що порушення чутливості до інсуліну супроводжується активацією транскрипційного фактору FOXO1, який індукує експресію ферменту [17].

Підвищення активності гемоксигенази

Гемоксигеназна активність у гомогенаті судин оварієктомованих щурів із інсулінорезистентністю, індукованою високофруктозною дієтою (n = 6)

Група	Гемоксигеназна активність, пмоль/хв./мг білка
Інтактний контроль	23,00 ± 3,51
Оварієктомія	17,67 ± 2,67
Оварієктомія + ВФД + плацебо	41,67 ± 4,23 ^{*,**}
Оварієктомія + ВФД + 17β-естрадіол	27,67 ± 4,41 ^Δ

Примітка. Як у табл. 2.

за умов інсулінорезистентності можна вважати компенсаторною реакцією, спрямованою на збереження ендотеліальної функції, оскільки продукти гемоксигеназної реакції позитивно впливають на реактивність судин щодо фізіологічних стимулів та збереження кровотоку за умов їх ушкодження. Так, монооксид вуглецю стимулює вазодилатацію, пригнічує агрегацію тромбоцитів, скупчення лейкоцитів та їх адгезію. Білівердин та білірубін є природними антиоксидантами, що виконують роль сквенджерів вільних радикалів та пригнічують розвиток ПОЛ, крім

того білівердин знижує експресію адгезивних молекул, а білірубін здатний пригнічувати експресію селектину та адгезію лейкоцитів [18].

Таким чином, введення 17β-естрадіолу призводить до зниження активності гемоксигенази у тканинах судин оварієктомованих щурів із інсулінорезистентністю, що може бути результатом усунення під впливом естрогену таких індукуючих факторів для даного ферменту, як інсулінорезистентність та оксидативний стрес.

ВИСНОВКИ

1. Інсулінорезистентність, індукована високофруктозною дієтою, у оварієктомованих щурів супроводжується підвищенням активності гемоксигенази та концентрації ТБК-активних продуктів в тканинах судин.
2. Введення 17β-естрадіолу щурам з інсулінорезистентністю на тлі гіпоестрогену

ніі запобігає підвищенню гемоксигеназної активності та концентрації ТБК-активних продуктів в тканинах судин, що може бути результатом зниження інсулінорезистентності та нормалізації прооксидантно-антиоксидантного стану і розглядатися як один із можливих механізмів вазопротекторної дії естрогену.

ЛІТЕРАТУРА

1. Коваленко, В. Н. Метаболический синдром: природа, механизмы, возможности системной энзимотерапии в его профилактике и лечении [Текст] / В. Н. Коваленко, Т. В. Талаева, В. В. Братусь // Журн. НАМН Украины. — 2011. — Т. 17, № 2. — С. 158–173.
2. Wiederkehr, A. Minireview: implication of mitochondria in insulin secretion and action [Text] / A. Wiederkehr, C. B. Wollheim // Endocrinology. — 2006. — Vol. 147. — P. 2643–2649.
3. Jayachandran, M. Mechanisms of estrogenic vascular protection [Text] / M. Jayachandran, V. M. Miller // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. — 2006. — Vol. 290. — P. H507–H508.
4. Dubey, R. K. Estrogen-induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical, and molecular mechanisms [Text] / R. K. Dubey, E. K. Jackson // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. — 2001. — Vol. 280. — P. F365–F388.
5. Ryter, S. W. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications [Text]

- / S. W. Ryter, J. Alam, A. M. K. Choi // *Physiol. Rev.* — 2006. — Vol. 86. — P. 583–650.
6. *Западнюк, И. П.* Лабораторные животные, их разведение, содержание и использование в эксперименте [Текст] / И. П. Западнюк, В. Ю. Западнюк, Е. А. Захарія. — К.: Гос. мед. изд-во УССР, 1962. — 253 с.
 7. *Levi, B.* Long-term fructose consumption accelerates glycation and several age-related variables in male rats [Text] / B. Levi, M. Werman // *J. Nutrition.* — 1998. — Vol. 128, № 8. — P. 1442–1449.
 8. Effects of estrogens on learning of rats with chronic brain cholinergic deficit in Morris water maze [Text] / T. V. Mukhina [et al.] // *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im.* — 2003. — Vol. 53, № 2. — P. 208–214.
 9. Fructosamine test-plus, a modified fructosamine assay evaluated / J. Baker, P. Metcalf, R. Scragg, R. Johnson // *Clin. Chem.* — 1991. — Vol. 37, № 4. — P. 552–556.
 10. The estrogen receptor-selective agonist propyl pyrazole triol improves glucose tolerance in ob/ob mice; potential molecular mechanisms [Text] / L. Lundholm, G. Bryzgalova, H. Gao [et al.] // *J. Endocrinol.* — 2008. — Vol. 199. — P. 275–286.
 11. *Sardana, M. K.* Hormonal regulation of heme oxygenase induction in avian hepatocyte culture [Text] / M. K. Sardana, S. Sassa, A. Kappas // *Biochem. Pharmacol.* — 1985. — Vol. 34, № 16. — P. 2937–2944.
 12. *Ohkawa, H.* Assay for peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction [Text] / H. Ohkawa, N. Ohani, K. Jada // *Anal. Biochem.* — 1979. — V. 95, № 2. — P. 351–358.
 13. *Гланс, С.* Медико-биологическая статистика [Текст] / С. Гланс; пер. с англ. Ю. А. Данилова. — М.: Практика, 1998. — 459 с.
 14. Bioenergetics of liver mitochondria in rats in experimental insulin-dependent diabetes [Text] / O. Ulicna, K. Volkovova, B. Istvanova [et al.] // *Bratisl. Lek. Listy.* — 1996. — Vol. 97, № 10. — P. 619–624.
 15. Вплив ендогенного та екзогенного естрадіолу на метаболічні прояви синдрому інсулінорезистентності у самиць щурів [Текст] / Н. І. Горбенко, С. В. Оксененко, О. Ю. Боріков [та ін.] // *Патологія.* — 2008. — Т. 5, № 2. — С. 53.
 16. Особливості метаболічних проявів синдрому інсулінорезистентності за умов дефіциту естрогенів у щурів [Текст] / Н. І. Горбенко, С. В. Оксененко, О. Ю. Боріков [та ін.] // *Практ. медицина.* — 2008. — Т. 14, № 2. — С. 118–126.
 17. *Zhiyong, C.* Insulin signaling meets mitochondria in metabolism [Text] / C. Zhiyong, T. Yolanda, F. Morris // *Whit. Tren. Endocrinol. Metabol.* — 2010. — Vol. 21. — P. 589–598.
 18. Mechanism of salutary effects of estradiol on organ function after trauma-hemorrhage: upregulation of heme oxygenase [Text] / L. Szalay, T. Shimizu, M. G. Schwacha [et al.] // *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2005. — Vol. 289. — P. H92–H98.

ВПЛИВ ЕКЗОГЕННОГО 17 β -ЕСТРАДІОЛУ НА АКТИВНІСТЬ ГЕМОКСИГЕНАЗИ ТА ВМІСТ ТБК-АКТИВНИХ ПРОДУКТІВ В СУДИНАХ ОВАРІЕКТОМОВАНИХ ЩУРІВ ІЗ ІНСУЛІНОРЕЗИСТЕНТНІСТЮ

Кіприч Т. В., Нікітченко І. В.¹, Горбенко Н. І.

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данілевського НАМН України», м. Харків;
¹Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна

Досліджено вплив екзогенного 17 β -естрадіолу на активність гемоксигенази та вміст ТБК-активних продуктів в судинах оваріектомованих щурів із інсулінорезистентністю. Встановлено, що інсулінорезистентність, індукована високофруктозною дієтою, в оваріектомованих щурів супроводжується підвищенням активності гемоксигенази та концентрації ТБК-активних продуктів в тканинах судин. Введення 17 β -естрадіолу запобігає підвищенню гемоксигеназної активності та вмісту ТБК-активних продуктів в тканинах судин, що може бути результатом зниження інсулінорезистентності та нормалізації прооксидантно-антиоксидантного стану, а також розглядатися як один із можливих механізмів вазопротекторної дії гормону.

К л ю ч о в і с л о в а: інсулінорезистентність, гемоксигеназа, 17 β -естрадіол.

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО 17β -ЭСТРАДИОЛА НА АКТИВНОСТЬ ГЕМОКСИГЕНАЗЫ И СОДЕРЖАНИЕ ТБК-АКТИВНЫХ ПРОДУКТОВ В СОСУДАХ ОВАРИЭКТОМИРОВАННЫХ КРЫС С ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ

Киприч Т. В., Никитченко И. В.¹, Горбенко Н. И.

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

¹*Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина*

Исследовано влияние экзогенного 17β -эстрадиола на активность гемоксигеназы и содержание ТБК-активных продуктов в сосудах овариэктомированных крыс с инсулинорезистентностью. Установлено, что инсулинорезистентность, индуцированная высокофруктозной диетой, у овариэктомированных крыс сопровождается повышением активности гемоксигеназы и концентрации ТБК-активных продуктов в тканях сосудов. Введение 17β -эстрадиола предотвращает повышение гемоксигеназной активности и концентрации ТБК-активных продуктов в тканях сосудов, что может быть результатом снижения инсулинорезистентности и нормализации прооксидантно-антиоксидантного состояния, а также рассматриваться как один из возможных механизмов вазопротекторного действия гормона.

К л ю ч е в ы е с л о в а: инсулинорезистентность, гемоксигеназа, 17β -эстрадиол.

THE IMPACT OF 17β -ESTRADIOL ON THE HEME OXYGENASE ACTIVITY AND TBA-ACTIVE PRODUCTS LEVEL IN VESSELS OF OVARIECTOMIZED RATS WITH INSULIN RESISTANCE

T. V. Kiprych, I. V. Nikitchenko¹, N. I. Gorbenko

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

¹*V. Karazin Kharkiv National University*

The effect of 17β -estradiol on the heme oxygenase activity and TBA-active products level in vessels of ovariectomized rats with insulin resistance was investigated. Insulin resistance induced by high fructose diet in ovariectomized rats led to increase in heme oxygenase activity and TBA-active products level in vessels. Administration of 17β -estradiol prevented increase in heme oxygenase activity and TBA-active products level, that could be explained by amelioration of insulin resistance and normalization of prooxidant-antioxidant state and could be considered the one of possible mechanisms of vasoprotective estradiol effect.

K e y w o r d s: insulin resistance, heme oxygenase, 17β -estradiol.