



УДК 612.174+612.346

**Т. М. Кучмеровська, Ю. Т. Пентек,**  
член-кореспондент НАН України **Г. В. Донченко, Л. В. Яніцька,**  
**М. М. Гузик, К. О. Дякун**

### **Окиснювальний стрес у серці щурів при експериментальному цукровому діабеті: ефект нікотинаміду**

*Показано, що у щурів, хворих на цукровий діабет, маса тіла була в 2,5 рази нижче, а концентрація глюкози в крові у 5 разів вище, ніж у тварин контрольної групи. Введення нікотинаміду (НАт, 100 мг/кг) діабетичним щурам незначною мірою знижувало рівень глюкози крові та не впливало на масу тіла. На тлі гіперглікемії збільшувався вміст ТБК-активних продуктів у сироватці крові та серці. При хронічному введенні НАт зменшувався вміст ТБК-активних продуктів як у сироватці крові, так і в серці, а також частково відновлювалася знижена при діабеті активність супероксиддисмутази в серці. Таким чином, нікотинамід може знайти застосування у лікуванні діабетичної кардіоміопатії.*

Серцево-судинні захворювання (ССЗ) є основною причиною смертності у всьому світі: з жодної іншої причини щорічно не помирає стільки людей, як від ССЗ. За оцінками ВООЗ, у 2008 р. від ССЗ померло 17,3 млн людей, що становило 30% загальної смертності у світі, з цього числа 7,3 млн — від ішемічної хвороби серця і 6,2 млн — у результаті інсульту. За прогнозами, кількість хворих на ССЗ, особливо на ішемічну хворобу серця, до 2030 р. сягатиме майже 24 млн людей. Більше того, саме ССЗ є основними ускладненнями цукрового діабету (ЦД), особливо ЦД 2 типу, які досить часто підвищують ризик смертності більше ніж у 60% хворих [1]. У свою чергу, розвиток ЦД, незалежно від наявності ішемічної хвороби серця, може призводити до виникнення кардіоміопатії в результаті пошкодження серцевого м'яза [2]. До дисфункцій міокарда при ЦД призводять метаболічні порушення в кардіоміоцитах. Це і зміни в енергетичному обміні, порушення поглинання кисню, ресинтезу АТФ та біосинтезу нуклеїнових кислот та протеїнів. Досить часто внаслідок тривалої гіперфункції міокарда при ЦД клітини міокарда зазнають значних енергетичних витрат, що може призводити не лише до дисфункцій міокарда, але і до його деструкції. При ЦД хронічна гіперглікемія є одним з найбільш значущих факторів ризику пошкодження серцевих м'язів [3].

© Т. М. Кучмеровська, Ю. Т. Пентек, Г. В. Донченко, Л. В. Яніцька, М. М. Гузик, К. О. Дякун, 2013

На даний час також увага приділяється ролі окиснювального стресу в розвитку серцево-судинних ускладнень при ЦД. Згідно з літературними даними, гіперглікемія призводить до активації цілого ряду біохімічних процесів (аутоокиснення глюкози, накопичення поліолів тощо), а також може “запускати” накопичення вільних радикалів, які, у свою чергу, викликають порушення функцій ендотелію та прискорюють розвиток атеросклерозу [4]. Ураження міокарда у хворих на ЦД також може бути спричинене розвитком мікроангіопатії, міокардіодистрофії та автономної нейропатії серця. При порушеннях функцій серця, зокрема у разі хронічної серцевої недостатності, у відповідь на активацію ренін-ангіотензинової системи, дію простагландинів, протизапальних цитокінів, які можуть викликати тканинну гіпоксію, утворюється велика кількість активних форм кисню (АФО). Тобто за таких умов розвивається окиснювальний стрес, який є результатом дисбалансу між надлишковим утворенням АФО та неспроможністю антиоксидантних систем забезпечити їх знешкодження [5]. При ЦД гіперглікемія призводить до надлишкової продукції АФО, які негативно впливають на процеси переносу електронів у мітохондріях, мембранний транспорт та ядерну транскрипцію, що викликає дисфункцію міокарда. При цьому система антиоксидантного захисту також зазнає істотних змін.

В зв'язку з вищезазначеним дослідження функціонального стану серцево-судинної системи при ЦД, а також пошук шляхів його корекції є надзвичайно важливими.

Однією із сполук, які могли б запобігати розвитку ЦД або пригнічувати його, є вітамін В<sub>3</sub>. Наша увага була зосереджена на його біологічно активній формі — нікотинаміді (NAm). Цей вітамін має широкий спектр дії, однією з ключових функцій якого є участь, як попередника, в синтезі нікотинамідних динуклеотидів, які відіграють важливу роль в енергетичних та біосинтетичних процесах. Так, NADPH є коензимом цитохрому P450, який залучений до детоксикації ксенобіотиків та є термінальним відновником для глутатіонредуктази, яка бере участь в утворенні відновленого глутатіону [6].

Метою дослідження було з'ясувати стан окиснювального стресу в тканині серця щурів при ЦД та можливість його корекції нікотинамідом.

**Матеріали та методи.** Дослідження проведені на щурах-самцях популяції Вістар масою 160–200 г. Тварин утримували в стандартних умовах віварію при вільному доступі до їжі та води. Дослідження здійснювали у відповідності до національних “Загальних етичних принципів експериментів на тваринах” (Україна, 2001) [7].

ЦД індукували введенням стрептозотоцину в дозі 55 мг/кг маси тіла, внутрішньоочеревинно. Після шести тижнів розвитку стрептозотоцинового діабету щурам протягом двох тижнів вводили нікотинамід у дозі 100 мг/кг, внутрішньоочеревинно. Тварин декапітували під пентабарбіталовим наркозом та швидко вилучали серце, яке поміщали в 0,32 М сахарозу, приготовану на 5 мМ *трис*-HCl буфері, рН 7,4. Готували гомогенат в співвідношенні 1 : 9 (маса тканини : об'єм). Кров відбирали для отримання сироватки. Всі процедури проводили при 4 °С.

Рівень глюкози крові визначали за допомогою глюкометра Precision Extra Plus (Medi-Sense UK Ltd., Великобританія). Вміст ТБК-активних продуктів визначали спектрофотометрично за їх реакцією з тіобарбітуровою кислотою, при цьому утворювався комплекс червоного кольору з максимумом поглинання при 532 нм [8]. Активність супероксиддисмутази (СОД, ЕС 1.15.1.11) у сироватці крові тварин оцінювали за методом, який ґрунтується на відновленні блідо-жовтого барвника нітросинього тетразолію до темно-фіолетового формагану [9]. Вміст білка визначали за методом Лоурі. Статистичну обробку результатів проводили за критерієм Стьюдента.

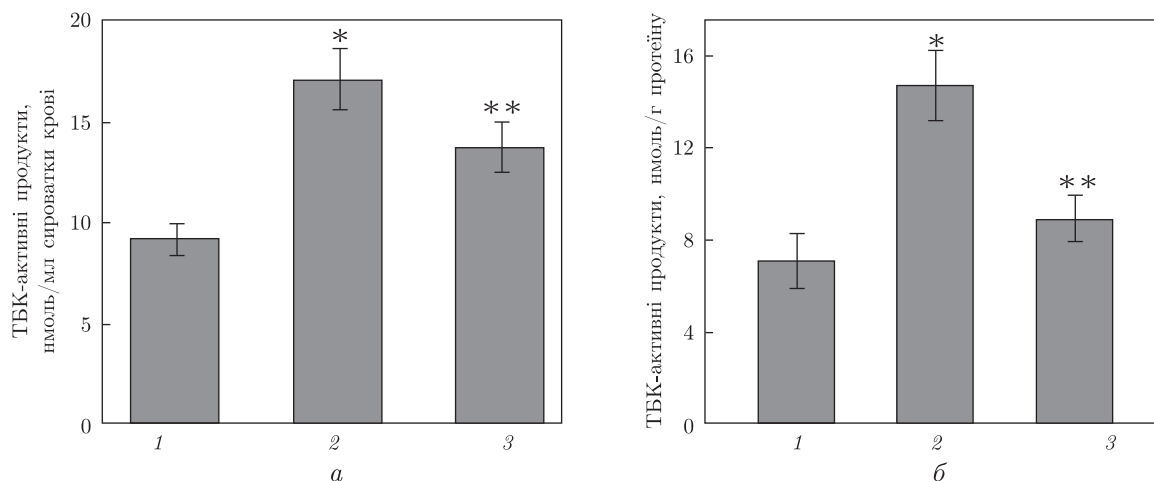


Рис. 1. Вміст ТБК-активних продуктів у сироватці крові (а) та в тканині серця (б) щурів досліджуваних груп: 1 — контроль; 2 — діабет; 3 — діабет + NAm ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ ). Тут і на рис. 2: \* — достовірність різниці в порівнянні з контролем,  $p < 0,05$ ; \*\* — достовірність різниці в порівнянні з діабетом,  $p < 0,05$

**Результати та їх обговорення.** По закінченні восьми тижнів розвитку діабету маса тіла діабетичних тварин знизилася у 2,5 рази порівняно з контрольними тваринами, тоді як рівень глюкози в крові щурів підвищився у 5 разів (табл. 1).

Цілком очевидно, що такі істотні зміни у функціонуванні організму тварин можуть призводити до розвитку окиснювального стресу та інтенсифікації процесів перексидного окиснення ліпідів (ПОЛ). Відомо, що підтримання фізіологічного рівня продуктів ПОЛ залежить від впливу на організм чинників ендо- чи екзогенного походження, які стимулюють чи гальмують їх утворення. Так, при патологіях, що супроводжуються розвитком тканинної гіпоксії, у тому числі і при ЦД, спостерігається порушення рівноваги між швидкістю утворення перексидних сполук та системою антиоксидантного захисту, що спричиняє посилене утворення вільних радикалів у тканинах та розвиток окиснювального стресу [10].

При оцінці можливості залучення процесів ПОЛ, як однієї з патогенетичних ланок у розвитку порушень функціонування серцево-судинної системи, було виявлено, що при ЦД посилюються процеси вільнорадикального окиснення ліпідів, свідченням чого є зростання вмісту ТБК-активних продуктів у сироватці крові та у тканині серця (рис. 1). Так, при ЦД вміст ТБК-активних продуктів у сироватці крові збільшувався майже у 2 рази порівняно з контролем, тоді як у серці — більш ніж у 2 рази (див. рис. 1). При введенні тваринам NAm утворення ТБК-активних продуктів знижувалося, причому в серці його дія була виражена більшою мірою.

Таблиця 1. Маса тіла та вміст глюкози в крові щурів ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ )

Група	Маса тіла, г		Глюкоза в крові, ммоль/л	
	Початкова	В кінці 8-го тижня	Початкова	В кінці 8-го тижня
Контроль	197 ± 15	383 ± 47	4,25 ± 0,52	4,31 ± 0,47
Контроль + NAm (100 мг/кг)	199 ± 16	369 ± 51	4,33 ± 0,55	4,18 ± 0,50
Діабет	212 ± 17	153 ± 14*	20,16 ± 1,30*	22,10 ± 1,72*
Діабет + NAm (100 мг/кг)	209 ± 19	223 ± 21**	19,35 ± 1,50	18,36 ± 1,62**

\* Достовірність різниці в порівнянні з контролем,  $p < 0,05$ .

\*\* Достовірність різниці в порівнянні з діабетом,  $p < 0,05$ .

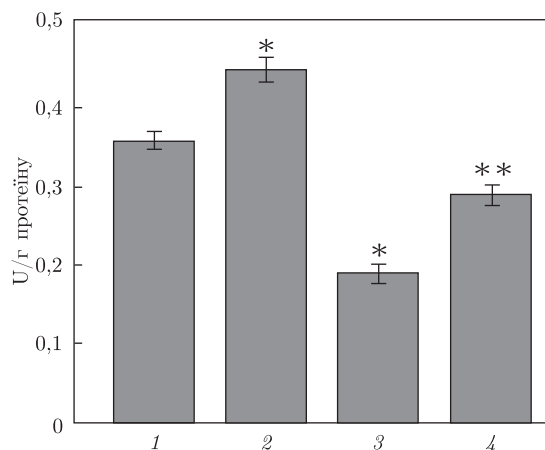


Рис. 2. Активність СОД у тканині серця щурів досліджуваних груп: 1 — контроль; 2 — контроль + NAm; 3 — діабет; 4 — діабет + NAm ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ )

Підвищення в тканині серця рівня кінцевих продуктів окиснення ліпідів при ЦД, безумовно, тією чи іншою мірою призводитиме до порушення структурної організації мембран кардіоміцитів. Імовірність патологічного характеру змін у таких ліпідозалежних процесах, як ліганд-рецепторна взаємодія, сигнальна трансдукція, іонний транспорт також може визначатись ступенем кардіотоксичності прооксидативних ефектів вільних радикалів на ліпідні компоненти біомембран та метаболічними перебудовами за умов хронічної гіперглікемії. Нещодавно було встановлено, що деструктивна дія ПОЛ на клітинні структури супроводжується змінами фосfolіпідного спектра [11]. Тобто значне підвищення вмісту ТБК-активних продуктів у досліджуваних зразках є наслідком інтенсифікації утворення АФО, що спричиняє розвиток окиснювального стресу та, не виключено, недостатньої або зниженої ефективності як ензимної, так і неензимної ланок системи антиоксидантного захисту, що узгоджується з даними літератури [12]. Оскільки гіперглікемія “запускає” розвиток цілого каскаду патологічних процесів, то очікуваним було те, що в організмі тварин баланс між прооксидантами та компонентами системи антиоксидантного захисту також буде зазнавати істотних змін. Крім того, відомо, що розвиток будь-якого патологічного процесу порушує цей баланс за рахунок посиленого утворення вільних радикалів чи шляхом зниження рівня доступних антиоксидантів, або ж за рахунок того та іншого. Тобто тривала, спричинена хронічною гіперглікемією активація ПОЛ може бути як наслідком декомпенсації з боку системи антиоксидантного захисту, так і призводити до виснаження її резервів.

Провідну роль у регуляції вільнорадикальних та пероксидних процесів відіграє ензимна система, серед компонентів якої важливе місце належить СОД, одному із основних ензимів цієї системи. При оцінці стану антиоксидантної системи захисту при ЦД, на тлі інтенсифікації окиснювального стресу, було виявлено, що активність СОД у сироватці крові діабетичних щурів знижувалася у 2 рази порівняно з відповідними показниками у групі контрольних щурів (рис. 2). Введення нікотинамідю приводило до часткового відновлення активності ензиму. Виявлені зміни активності СОД у серці щурів можуть бути обумовлені модифікацією ензиму як АФО, так і глюкозою та фруктозою. Згідно з даними літератури, за умов інтенсифікації ПОЛ, зниження активності СОД є результатом накопичення АФО, які здатні взаємодіяти з іонами металів у активному центрі ензиму або впливати на ступінь їх відновленості [13]. Також відомо, що зниження активності СОД може відбуватися

в результаті взаємодії активного центру ензиму з деякими інтермедіатами ліпопероксидації, зокрема з ендогенними гідропероксидами ненасичених жирних кислот [14]. Ще однією з основних причин інгібування активності СОД може бути глікозилювання ензиму, оскільки є дані, що свідчать про зростання рівня глікозилюваної Cu, Zn-СОД більше ніж у 2 рази у щурів із стрептозотоциновим діабетом [15].

Таким чином, на основі отриманих результатів, можна зробити висновок, що незалежно від того, чи є процеси вільнорадикального пошкодження серцево-судинної системи за умов їх інтенсифікації пусковим, первинним елементом у розвитку дисфункцій серця, цілком очевидно залучення прооксидативного компонента в опосередкування індукованого гіперглікемією стійкого прогресування цього ускладнення цукрового діабету. Тобто нормалізуюча дія нікотинаміду на серцево-судинну систему при ЦД може реалізуватися завдяки його антиоксидантній здатності, що сприятиме його використанню як важливої складової в терапевтичній схемі лікування серцево-судинних ускладнень цукрового діабету.

1. *Dokken B. B.* The Pathophysiology of Cardiovascular Disease and Diabetes: Beyond Blood Pressure and Lipids // *Diabetes Spectrum*. – 2008. – **21**, No 3. – P. 160–165.
2. *Дедов И. И., Александров А. А.* Диабетическое сердце: Causa Magna // *Сердце*. – 2004. – **3**, № 1. – С. 5–8.
3. *Takayuki M., Takahito I., Daisuke S., Tetsuji M.* Effects of diabetes on myocardial infarct size and cardioprotection by preconditioning and postconditioning // *Cardiov. Diabetol.* – 2012. – **11**. – P. 67–80.
4. *Yamagishi S.* Advanced glycation end products and receptor-oxidative stress system in diabetic vascular complications // *Therapeutic Apheresis and Dialysis*. – 2009. – **13**, No 6. – P. 534–539.
5. *Sawyer D. B.* Oxidative Stress in Heart Failure: What are we missing? // *Am. J. Med. Sci.* – 2011. – **342**, No 2. – P. 120–124.
6. *Pollak N., Dolle C., Ziegler M.* The power to reduce: pyridine nucleotides-small molecules with a multitude of functions // *J. Biochem.* – 2007. – **402**, No 2. – P. 205–218.
7. *Резніков О. Г.* Загальні етичні принципи експериментів на тваринах // *Ендокринологія*. – 2003. – **8**, № 1. – С. 142–145.
8. *Гаврилов В. Б., Гаврилова А. П., Мажуль Л. М.* Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой // *Вопр. мед. химии*. – 1987. – **33**, № 1. – С. 118–122.
9. *Ewing J. F., Janero D. R.* Microplate superoxidedismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator // *Anal. Biochem.* – 1995. – **232**. – P. 243–248.
10. *Vincent A. M., McLean L. L., Backus C., Feldman E. L.* Short-term hyperglycemia produced oxidative damage and apoptosis neurons // *FASEB J.* – 2005. – **19**, No 6. – P. 638–640.
11. *Chun-jun Li, Lin Lv, Hui Li, De-min Yu.* Cardiac fibrosis and dysfunction in experimental diabetic cardiomyopathy are ameliorated by alpha-lipoic acid // *Cardiov. Diabetol.* – 2012. – **11**. – P. 73–83.
12. *Merzouk S., Hichami A., Sari A. et al.* Impaired oxidant/antioxidant status and LDL-fatty acid composition are associated with increased susceptibility to peroxidation of LDL in diabetic patients // *Gen. Physiol. Biophys.* – 2004. – **23**. – P. 387–399.
13. *Goldstone A. B., Liochev S. I., Fridovich I.* Inactivation of copper, zinc superoxide dismutase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: mechanism of protection // *Free Radic. Biol. Med.* – 2006. – **41**, No 12. – P. 1860–1863.
14. *Caballero F., Gerez E., Battle A., Vazquez E.* Preventive aspirin treatment of streptozotocin induced diabetes: blockage of oxidative status and reversion of heme enzymes inhibition // *Chem. Biol. Interact.* – 2000. – **126**, No 3. – P. 215–225.
15. *Peyroux J., Sternberg M.* Advanced glycation endproducts (AGEs): Pharmacological inhibition in diabetes // *Pathol. Biol. (Paris)*. – 2006. – **54**, No 7. – P. 405–419.

**Т. М. Кучмеровская, Ю. Т. Пентек,**  
член-корреспондент НАН Украины **Г. В. Донченко, Л. В. Яницкая,**  
**М. М. Гузык, Е. О. Дякун**

### **Окислительный стресс в сердце крыс при экспериментальном сахарном диабете: эффект никотинамида**

*Показано, что у крыс, больных сахарным диабетом, масса тела в 2,5 раза ниже, а концентрация глюкозы в крови в 5 раз выше, чем у животных контрольной группы. Введение никотинамида (NAм, 100 мг/кг) диабетическим крысам в незначительной степени снижало уровень глюкозы в крови, но не влияло на массу тела. На фоне гипергликемии содержание ТБК-активных продуктов в сыворотке крови и сердце было увеличено. При хроническом введении NAм снижалось содержание ТБК-активных продуктов как в сыворотке крови, так и в сердце, а также частично восстанавливалась сниженная при диабете активность супероксиддисмутазы в сердце. Таким образом, никотинамид может найти применение в лечении диабетической кардиомиопатии.*

**T. M. Kuchmerovska, Yu. T. Pentek,**  
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **G. V. Donchenko, L. V. Yanitska,**  
**M. M. Guzyk, K. O. Dyakun**

### **Oxidative stress in rat hearts induced by experimental diabetes: effect of nicotinamide**

*It is shown that body weights were 2.5 times lower in diabetic rats than those in controls, while blood glucose concentrations were 5 times higher in diabetic rats as compared with controls. NAm (100 mg/kg) treatment did not statistically affect the weight gain in diabetic rats. Hyperglycemia was accompanied by the increase of TBARS contents in serum blood and heart. Treatment with NAm diminished TBARS both in serum blood and heart and partially restored the activity of superoxide dismutase in hearts, which was significantly reduced by diabetes. Thus, nicotinamide may be useful in treatment of diabetic cardiomyopathy.*