

ПРОТЕКТОРНА ДІЯ ВИНОГРАДНИХ ВИН ЗА НІТРОЗАТИВНОГО СТРЕСУ, ЗУМОВЛЕНОГО ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ

В. Р. ДРЕЛЬ¹, А. Р. ГНАТУШ¹, А. Я. ЯЛАНЕЦЬКИЙ², В. Г. ГЕРЖИКОВА²,
В. І. МІЗІН², В. А. ЗАГОРУЙКО², Н. О. СИБІРНА¹

¹Львівський національний університет ім. Івана Франка, Україна;
e-mail: sybirna_natalia@yahoo.com;

²Національний інститут винограду та вина "Магарач", Ялта, Україна

Виявлено, що за оксидативно-нітрозативного стресу, зумовленого цукровим діабетом, червоне та біле виноградні вина, поліфеноли яких вважаються основними діючими речовинами, знижують рівень нітротирозин-модифікованих протеїнів до рівня контролю в сідничному нерві, дорсальних спинномозкових гангліях та спинному мозку щурів. Показано нормалізацію активності полі(ADP-рибозо)полімерази-1 в сідничному нерві діабетичних щурів під дією червоного вина. За час експерименту виявлено зростання маси тіла контрольних щурів та тварин із цукровим діабетом, яким вводили червоне вино на 52 та 19% відповідно.

Одержані результати свідчать про можливість застосування червоних вин та створення препаратів на їхній основі для профілактики та лікування ускладнень цукрового діабету.

Ключові слова: цукровий діабет, оксидативно-нітрозативний стрес, червоне та біле вина, периферична нервова система.

Останнім часом захворюваність на діабет досягла епідемічних показників. Так, за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я у 2009 році більше 240 млн. людей хворіли на цукровий діабет. Смертність від діабетичних ускладнень становить понад 3 млн. людей на рік. Відомо, що виникнення діабету 2-го типу, якому належить 85–90% серед усіх форм захворювань на діабет, супроводжується розвитком інсулінорезистентності. У 40% хворих на діабет, які контролюють рівень глюкози у крові та вживають антидіабетичні препарати, проте виникають та розвиваються хронічні ускладнення в периферичній нервовій системі. За гіперглікемії виникають мікро- і макроангіопатії, множинні патологічні зміни у багатьох тканинах та органах, з яких периферична нервова система, нирки та сітківка ока є одними з найуразливіших. Так, мікроангіопатії поряд із частковою втратою епідермальних нервових закінчень, демієлінізацією аксонів периферичних нервів та, відповідно, сповільненням передачі сигналів моторними та сенсорними нервами призводить до виникнення синдрому «діабетичної стопи» [1].

Внаслідок гіперглікемії посилюється утворення вільних радикалів, в першу чергу супероксид-аніону, який взаємодіючи з іншими активними формами кисню перетворюється у

гідроксил-радикал, пероксид водню та пероксинітрит (ONOO⁻) [2]. Зростання вмісту пероксинітриту, який на сьогодні є визнаним оксидантом номер один у біологічних системах, призводить до розвитку оксидативно-нітрозативного стресу, що супроводжується нітрозилуванням протеїнів, пероксидним окисленням ліпідів, розривами в ДНК, змінами у клітинній сигналізації, активацією полі(ADP-рибозо)полімерази-1 (PARP-1), індукцією некрозу та апоптозу. Високий вміст нітрозильованих протеїнів за залишками тирозину у тканинах організму є одним із ранніх маркерів, який свідчить про початок або наявність хронічних ускладнень при цукровому діабеті [3]. Так, підвищений рівень нітрозильованих протеїнів було виявлено як за діабету 1-го, так і 2-го типів у сідничному нерві (шванівських клітинах), нирках (мезангіальних клітинах) та сітківці ока [3, 4]. Існують дані про те, що традиційні антиоксиданти (вітамін Е і С, дибунол та ін.) є малоефективними в руйнуванні та запобіганні утворення пероксинітриту [5].

Дослідженнями в останні роки виявлено важливу роль поліфенолів червоних виноградних вин, серед яких вирізняють проантоціаніди, похідні катехінів та низку інших похідних флавоноїдів, у профілактиці серцево-судинних захворювань [6]. Відомо, що поліфеноли

червоних вин здатні взаємодіяти з протеїнами плазми та клітинними елементами крові, запобігаючи передчасному окисленню їхніх молекулярних комплексів, спричиненому оксидативним стресом. Також показано значну бактерицидну та антивірусну дію цих речовин. За оксидативного стресу виявлено протекторну дію поліфенолів червоних вин на функціонування деяких систем та органів при цукровому діабеті та метаболічному синдромі [7]. Однак питання стосовно протекторної здатності виноградних вин на функціонування периферичної нервової системи за цукрового діабету на сьогодні є маловивченим.

Метою роботи було дослідити та порівняти вплив червоного та білого вин, основними діючими речовинами яких вважають поліфеноли, на здатність запобігати утворенню нітротирозинмодифікованих протеїнів та активації PARP-1 у периферичній нервовій системі щурів при експериментальному цукровому діабеті.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Вістар з масою тіла 120–150 г. Експерименти проводили згідно із «Загальними принципами роботи на тваринах», затвердженими І Національним конгресом по біоетиці (Київ, Україна, 2001) і погодженими з положеннями «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, Франція, 1985).

У роботі використовували кролячі анти-нітротирозинові антитіла (Upstate, США), мишачі анти-полі(ADP)-рибоза антитіла (Trevigen, Inc., США), козячі анти-кролячі, мічені Alexa Fluor 488, (Molecular Probes, США), козячі анти-кролячі, мічені пероксидазою, (Vector Laboratories, США), реагент для посилення флуоресцентного сигналу гістохімічних зрізів (Invitrogen, США), реактив для посиленої хемілюмінесценції (Amersham, Велика Британія).

Для індукції 1-го типу діабету щурам внутрішньочеревно вводився стрептозотонин (50 мг/кг) в цитратному буфері (рН 5,5). Хворими на діабет вважалися ті тварини, в яких рівень глюкози у крові був > 13,8 мМ/л (240 мг/дл). Вміст глюкози вимірювали за допомогою глюкометра «Ассі-Сheck» на 3-ю добу після індукції діабету та в кінці 4-тижневого періоду захворювання.

Щури споживали розведене у питній воді вино у дозі, що відповідає 300 мл вина/70 кг

маси тіла/добу (з моніторингом та корекцією об'єму кожної доби), протягом двох тижнів перед та протягом місяця після індукції діабету. Вибрана нами концентрація вина є середньою по відношенню до низьких (150–200 мл) та високих концентрацій (400–500 мл вина/70 кг маси тіла/добу) [7]. Біле столове вино було виготовлене з винограду сорту «Ркацителі» за кахетинською технологією, червоне – з винограду сорту «Каберне-Совіньон» за класичною технологією. Вміст титрованих кислот був 4,5, та 5,47 г/дм³; масова концентрація фенольних сполук – 1700,00 та 2309,31 мг/дм³ відповідно; масова концентрація барвників становила 0 та 443,8 мг/дм³ відповідно, а масова концентрація проціанідинів – 780,0 та 936,0 мг/дм³ відповідно.

Щурів було розділено на 6 груп: 1) контрольні щури (К); 2) контрольні щури, які одержували біле вино (К+БВ); 3) контрольні щури, які одержували червоне вино (К+ЧВ); 4) щури хворі на діабет (Д); 5) щури, хворі на діабет, які одержували біле вино (Д+БВ); 6) щури хворі на діабет, які одержували червоне вино (Д+ЧВ).

По закінченні експерименту щурів декапітували. Половину препаративного матеріалу (сідничний нерв, дорсальні спинномозкові ганглії (ДСМГ) поперекового відділу, спинний мозок) негайно заморожували в рідкому азоті для подальших експериментів з використанням імуноблот-аналізу, а другу половину фіксували в 4%-му забуференому формаліні для імуногістохімічного аналізу.

Заморожені зразки тканин зважували, гомогенізували в буфері екстракції протеїнів (1 : 10 вага/об'єм, у скляному гомогенізаторі (Kimble-Kontes, США) на льодяній бані при 4 °С. Буфер екстракції містив 50 мМ трис-НСl, рН 7,2; 150 мМ NaCl; 0,1% додецилсульфату натрію (SDS); 1% NP-40; 5 мМ ЕДТА; 1 мМ EGTA; 1% дезоксихолату натрію та інгібіторів протеаз і фосфатаз: 1 мМ фенілметансульфонілфторид (PMSF) (Fluka, Швейцарія), 10 мМ бензамідин (Sigma, США), 20 мкг/мл апротиніну (Sigma, США), 10 мкг/мл лейпептину (Sigma, США), 1 мкг/мл пепстатину (Fluka, Швейцарія), 1 мМ Na₃VO₄ (Sigma, США). Гомогенат додатково обробляли на ультразвуковому дезінтеграторі (3 рази по 10 сек) та залишали екстрагуватися на льоду 20 хв. Нерозчинну в детергенті фракцію осаджували центрифугуванням при 14 000 g протягом 20 хв при 4 °С. Концентрацію протеїну визначали методом Петерсона [8]. Для наступного розділення протеїнів у поліакриламідному гелі (ПААГ), загальний протеїн лізатів тканин (10–

100 мкг) змішували з буфером для нанесення (62,5 мМ трис-НСІ, 1 мМ ЕДТА, 2% SDS, 5% β -меркаптоетанол, 10% гліцерол, 0,025% бромфеноловий синій, рН 6,8) у співвідношенні 1 : 1 (v/v) і прогрівали 5 хв на водяній бані при 95 °С [9]. Електрофорез в ПААГ проводили в буферній системі Леммлі [9]. Для визначення молекулярної маси протеїнів на електрофореграмах використовували стандарти протеїнів Kaleidoscope prestained standards (Bio-Rad Laboratories, США).

Після електрофорезу протеїни переносили з ПААГ під дією електричного струму протягом 2 год при 250 мА [10] в камері для електрофорезу та електропереносу Mini-Protean III (Bio-Rad Laboratories, США) на нітроцелюлозну мембрану (Whatman, Велика Британія) у буфері, що містив: 25 мМ трис-НСІ (рН 8,3), 20%-й метанол, 192 мМ гліцин. Вільні центри зв'язування блокували протягом 2 год 2%-им БСА в забуференому (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 4,3 мМ Na₂HPO₄, 1,7 мМ KH₂PO₄, рН 7,3) фізіологічному розчині (ЗФР) з 0,05% твіну-20. Мембрану інкубували з першим антитілом (поліклональним антинітротирозиновим у розведенні 1 : 1000) у блокуючому буфері протягом 2 год. Відмивали мембрану у ЗФР з 0,1% твіну-20 3 рази по 5 хв. Відмиту мембрану інкубували з другим антитілом, міченими пероксидазою хрому: антикролячим, у розведенні 1:2000, у блокуючому буфері протягом 1 год. Мембрану відмивали у ЗФР з 0,1% твіну-20, 3 рази по 5 хв. Імунореактивні сигнали на мембрані виявляли за допомогою інкубації мембрани з реактивами для посиленої хемілюмінесценції (згідно з протоколом виробника). Мембрану після інкубації з хемілюмінесцентними реактивами експонували на рентгенівській плівці. Плівку проявляли у стандартному фенідон-гідрохіноновому проявнику та фіксували кислим фіксажем. Для контролю однакового вмісту протеїнів у пробах, мембрану звільняли від перших та других антитіл у буфері, що містив: 25 мМ гліцин-НСІ, рН 2,5; 1% SDS протягом 30 хв. Мембрану повторно блокували в блокуючому буфері протягом 30 хв та повторно інкубували з анти- β -актиновими антитілами (Sigma, США). Денситограму інтенсивності сигналів на відсканованих рентгенівських плівках проводили з допомогою програми Gel Pro Analyser 3.1.

Після фіксації тканини відмивали ЗФР та переносили в 70%-й етиловий спирт з наступною дегідратацією та заливкою у парафінові блоки. Депарафінізацію, гідратацію та відновлення антигензв'язувальних детермінант

5 мкм секцій сідничних нервів (поздовжнього перерізу), дорсальних спинно-мозкових гангліїв та спинного мозку (поперечного перерізу) здійснювали як описано [11]. Вільні центри зв'язування блокували за допомогою інкубування протягом 1 год в 1%-му розчині БСА та 10%-му розчині сироватки кози у ЗФР. Для детекції полі-(ADP)-рибозильованих протеїнів секції інкубували протягом ночі при 4 °С з першим моноклональним анти-полі-(ADP)-рибозильним антитілом у розведенні 1 : 250 у ЗФР, який містив 1% БСА. Відмиті у ЗФР з 0,05%-им тритоном X-100 секції знову інкубували протягом 1 год з другим козячим антимишачим антитілом, міченим Alexa Fluor 488 в робочому розведенні 1 : 200 у ЗФР, який містив 1% БСА. Інкубацію здійснювали у присутності флуоресцентного хромогену в камері, захищеній від денного світла.

Флуоресцентну мікроскопію сідничних нервів, ДСМГ та сірої речовини спинного мозку (дорсальний ріг) здійснювали за допомогою x40 акропланового об'єктива мікроскопа Nikon Optiphot 2 (Nikon, Японія) та відеокамери для мікроскопа DCM310 з програмним забезпеченням ScorePhoto. Інтенсивність сигналів на знімках визначали за допомогою програмного забезпечення ImageJ 1.32 software (National Institutes of Health, США); імуногістохімічні результати оцінювали як $M \pm m$ для кожної експериментальної групи. Для кожної тварини із певної тканини знімали 5–7 фотографій та розраховували середнє значення інтенсивності свічення. Репрезентативні фотографії представляли середнє значення інтенсивності свічення для кожної групи ($n = 5–7$).

Статистичне оброблення одержаних даних проводили з використанням загальноприйнятих методів параметричної і непараметричної варіаційної статистики. У разі множинних співвідношень груп використовували критерії Стьюдента-Ньюмана-Кейля та багатofакторного дисперсійного аналізу ANOVA (F-значення). Дані представлені у вигляді $M \pm m$ для кожної експериментальної групи. Достовірними вважали результати за показників вірогідності $P \geq 0,95$ (рівень значимості $P < 0,05$). Статистичне оброблення експериментальних даних проводили за допомогою програми Origin 7.0, Biostat 2008, Excel-2003.

Результати та обговорення

По закінченні експерименту кінцева маса контрольних шурів та шурів, які споживали біле та червоне вина збільшується в середньому на 52% порівняно із початком експерименту

(таблиця). На відміну від контролю, у групах діабетичних тварин і діабетичних тварин, які споживали біле вино, маса тіла щурів незначно зменшується. Водночас у діабетичних щурів, які споживали червоне вино, вона достовірно збільшується на 19% порівняно з вихідними даними на момент початку експерименту ($P < 0,05$). Із результатів представлених в таблиці, за порівняння показників, одержаних на початку та по закінченні експерименту, видно наростання гіперглікемії в діабетичних групах тварин, а також відсутність гіпо- та гіперглікемічних ефектів у групах тварин, яким давали виноградні вина.

Іншими дослідниками було показано, що відносно високі дози ресвератролу (представника фітоалексинів), який входить до складу поліфенолів червоних виноградних вин, достовірно знижують рівень глюкози до норми у щурів із діабетом, індукованим стрептозотоцином [12]. Одержані результати вказують на те, що зниження глюкози у крові діабетичних тварин залежить як від одержаної дози, так і від сорту вина.

Встановлено, що червоне вино не знижує рівня глюкози у крові діабетичної групи щурів, які його споживали, в той же час спостерігається збільшення маси тіла ($P < 0,05$). Відомо, що при цукровому діабеті (в основному 1-го типу) відбувається накопичення кетонів тіл із наступною дегідратацією тканин організму, яка спричинює зниження маси тіла тварин. При цьому розвивається кетоацидоз і кома, яка може призвести до смерті [13, 14]. Можна припустити, що протекторна дія червоного вина здійснюється на етапі утилізації/виведення з організму кетонів тіл системою клубочків та каналців нирок і стимуляції реабсорбції електролітів і води із первинної

сечі, однак таке припущення потребує подальших досліджень.

Роль активних форм азотвмісних сполук, у тому числі пероксинітриту, в патогенезі діабету та його ускладнень є визначальною [3, 11]. Так, нітротирозин як маркер оксидативно-нітрозативного стресу акумулюється в ендотелії судин, серці [3], сітківці ока та нирках тварин із діабетом, індукованим стрептозотоцином, а також у кровотоці [15], підшкірних кровоносних судинах, міокарді та нирках людей, хворих на цукровий діабет як 1-го, так і 2-го типів. У низці робіт показано, що нітротирозин накопичується в сідничному нерві, сірій речовині спинного мозку, дорсальних спинномозкових гангліях щурів і мишей, хворих на цукровий діабет, Zucker-ожирілих та Zucker-ожирілих діабетичних щурів, а також лептин-нокаутних мишах, і мишах, які споживали їжу з високим вмістом жиру [16, 17]. Ці дані вказують на наявність ушкоджень периферичної нервової системи, індукованих пероксинітритом як на ранніх, так і пізніх етапах цукрового діабету 1-го і 2-го типів, а також на предіабетичних стадіях.

Встановлено, що підвищений вміст нітротирозину у плазмі крові корелює із ендотеліальними дисфункціями та перерозподілом іннервації судомоторних нервів та їхніх реакцій і є раннім маркером функціональних порушень симпатичної нервової системи. По суті рівень нітротирозину – один із важливих інтегрованих факторів, що свідчить про розвиток периферичних діабетичних нейропатій у пацієнтів, хворих на цукровий діабет 1-го типу [15].

За допомогою імуноблот-аналізу виявлено зростання на 48% вмісту протеїнів, модифікованих нітротирозином у сідничному нерві

Маса тіла та концентрація глюкози у крові контрольних та хворих на діабет щурів, які споживали червоне та біле вина ($M \pm m$, $n = 5-7$)

Групи тварин	Вміст глюкози у крові, мМ		Маса тіла, г	
	Початковий §	Кінцевий	Початковий §	Кінцевий
К	6,2 ± 0,9	6,1 ± 1,3	136,6 ± 15,5	208,8 ± 18,9
К + БВ	6,0 ± 1,3	6,1 ± 1,2	148,8 ± 9,8	202,4 ± 16,7
К + ЧВ	6,4 ± 0,7	6,5 ± 0,9	138,8 ± 12,4	203,4 ± 18,4
Д	14,5 ± 1,4**	23,2 ± 2,4**	141,0 ± 11,7	133,4 ± 8,2**
Д + БВ	14,3 ± 1,5**	23,1 ± 3,7**	147,0 ± 9,9	138,0 ± 14,4**
Д + ЧВ	14,1 ± 1,7**	24,4 ± 4,8**	144,0 ± 13,9	171,8 ± 10,9*#

*,** $P < 0,05$ та $P < 0,01$, відповідно, проти контрольної групи; # $P < 0,05$ проти групи щурів, хворих на діабет, яким не давали вина; § – 3-а доба після індукції діабету.

щурів, хворих на діабет (рис. 1, А, Б), на 60% у дорсальних спинномозкових гангліях (рис. 2, А, Б) та на 40% у спинному мозку (рис. 3, А, Б). За дії червоного вина спостерігали часткове (сідничний нерв) та повне (ДСМГ, спинний мозок) повернення рівня нітротирозину до рівня контролю у тварин, хворих на діабет. Водночас у разі споживання білого вина має місце часткове зменшення рівня нітротирозину у ДСМГ та тенденція до його зменшення в сідничному нерві та спинному мозку.

Визначення вмісту нітротирозину в сідничному нерві, ДСМГ та у спинному мозку показало його зростання у групі щурів із діабетом на 48, 60 та 40% відповідно. Відомо, що запобігання утворенню пероксинітриду як за допомогою агентів, що його розщеплюють [17], так і опосередковано через інгібування PARP-1 та альдозоредуктази (поліоловий шлях) [18], зумовлює відновлення провідності сенсорних і моторних нервів та епідермальних нервових закінчень. Можна припустити, що червоне вино частково або повністю запобігає зростанню нітрозильованих протеїнів і, таким чином, відновлює або стабілізує функціонування периферичної нервової системи. Слід також зазначити, що нещодавні клінічні дослідження показали кореляцію між накопиченням пероксинітриду у кровотоці та наявністю ускладнень периферичної нервової системи при діабеті та нейропатією автономної нервової системи серця в людей, хворих на цукровий діабет [19].

Ушкодження, спричинені пероксинітридом, можуть призводити до моторних і сенсорних нейропатій через різні механізми, серед яких активація PARP-1 посідає одне із провідних місць [17]. Так, у відповідь на ушкодження ДНК активними формами кисню активується репараційний комплекс, до складу якого входить ензим PARP, який полі-(ADP)-рибозилує понад 300 протеїнів ядра і окремих цитоплазматичних протеїнів. Серед цитоплазматичних протеїнів є ензим гліколітичного циклу гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (G-3-PD). Пригнічення активності G-3-PD поряд із високим вмістом глюкози у клітині призводить до активації низки метаболічних та сигнальних шляхів, внаслідок чого накопичуються метаболіти (сорбітол, фруктоза, уридинфосфат-N-ацетилглюкозамін, метилглюксаль (альдегідна форма пірвіноградної кислоти), не характерні для фізіологічних процесів у нормі. Все це призводить до значного посилення неензиматичного глікозилювання та запальних процесів [2].

Інтенсивність світіння на імунофлуоресцентних знімках, за яким визначали вміст полі-(ADP)-рибозильованих протеїнів (продуктів активованого ензиму PARP-1) у ядрах шванівських клітин сідничного нерва зростає на 51% в щурів, хворих на діабет. Це зростання нівелювалося у разі споживання червоного вина (рис. 4, А, Б). Біле вино спричинює часткове зменшення вмісту полі-(ADP)-рибози-

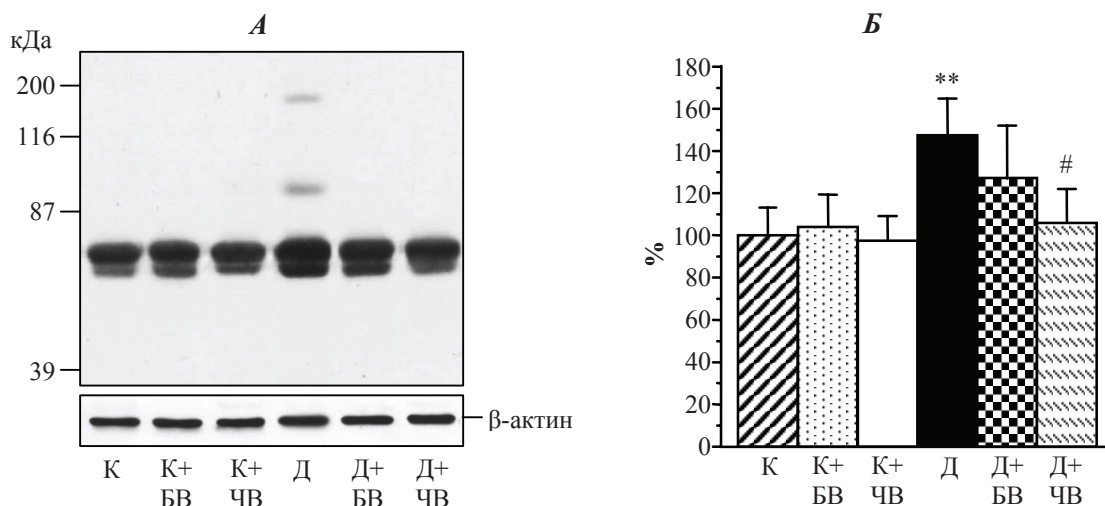


Рис. 1. Репрезентативний імуноблот-аналіз зразків сідничного нерва щурів із використанням анти-нітротирозинових антитіл (А) та вміст нітротирозин-модифікованих протеїнів (Б), (денситограма з використанням програми GelPro 3.1). Вміст нітротирозину в контрольній групі прийнято за 100% ($M \pm m$, $n = 5-7$). ** $P < 0,01$ проти контрольної групи. # $P < 0,05$ проти групи щурів, хворих на діабет, яким не давали вина

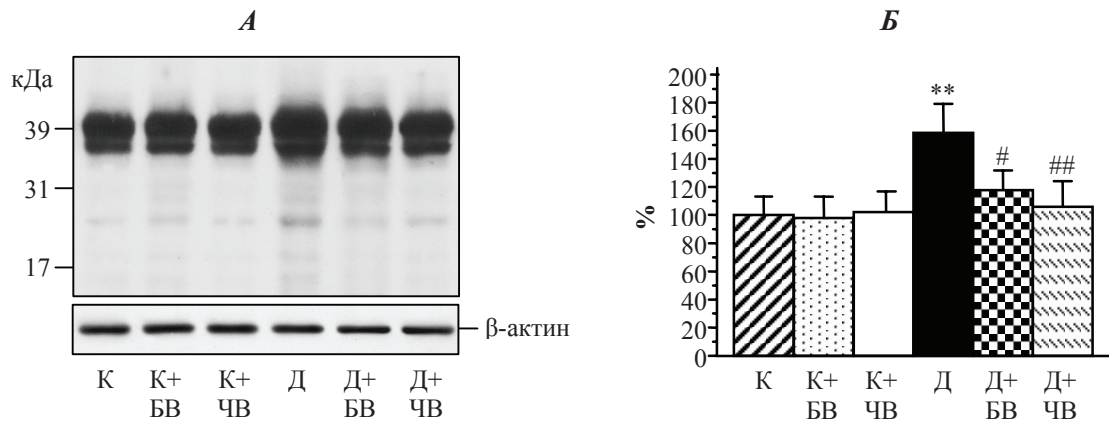


Рис. 2. Репрезентативний імуноблот-аналіз зразків ДСМГ щурів із використанням антинітротирозинових антитіл (А) та вміст нітротирозинмодифікованих протеїнів (Б), (денситограма з використанням програми GelPro 3.1). Вміст нітротирозину в контрольній групі прийнято за 100% ($M \pm m$, $n = 5-7$). ** $P < 0,01$ проти контрольної групи. #, ## $P < 0,05$ та $< 0,01$ проти групи щурів, хворих на діабет, яким не давали вина

льованих протеїнів у групі діабетичних щурів. Водночас у дорсальних спинномозкових гангліях та спинному мозку вміст полі-(ADP)-рибозильованих протеїнів у контрольних і діабетичних групах щурів значно не відрізняється між собою (рис. 5, А, Б та В). Мікрофотографії відповідних тканин інших груп тварин не представлено, оскільки вони не відрізняються між собою.

Відомо, що патологічні зміни при нейропатіях виникають, розвиваються і поширюються в дистальних частинах нервів. Так,

при діабетичних нейропатіях спочатку відбувається втрата сенсорної чутливості (зменшення кількості епідермальних нервових закінчень), а потім демієлінізація нерва із втратою швидкості провідності сенсорних та моторних нервів. Дегенерація як окремого аксона, так і нервового волокна відбувається в напрямку із периферії до центру і характеризується терміном «смерть назад» [20]. Одержані результати вказують на те, що при 4-тижневому діабеті у щурів активується PARP-1 у сідничному нерві, однак така активація відсутня у дорсальних

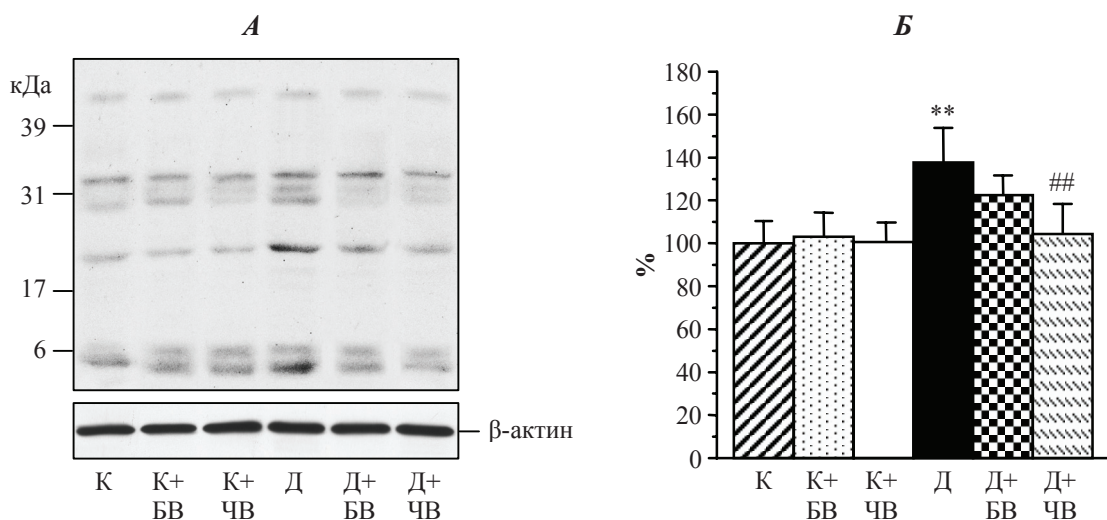


Рис. 3. Репрезентативний імуноблот-аналіз зразків спинного мозку щурів із використанням антинітротирозинових антитіл (А) та вміст нітротирозин-модифікованих протеїнів (Б), (денситограма з використанням програми GelPro 3.1). Вміст нітротирозину в контрольній групі прийнято за 100% ($M \pm m$, $n = 5-7$). ** $P < 0,01$ проти контрольної групи. ## $P < 0,01$ проти групи щурів, хворих на діабет, яким не давали вина

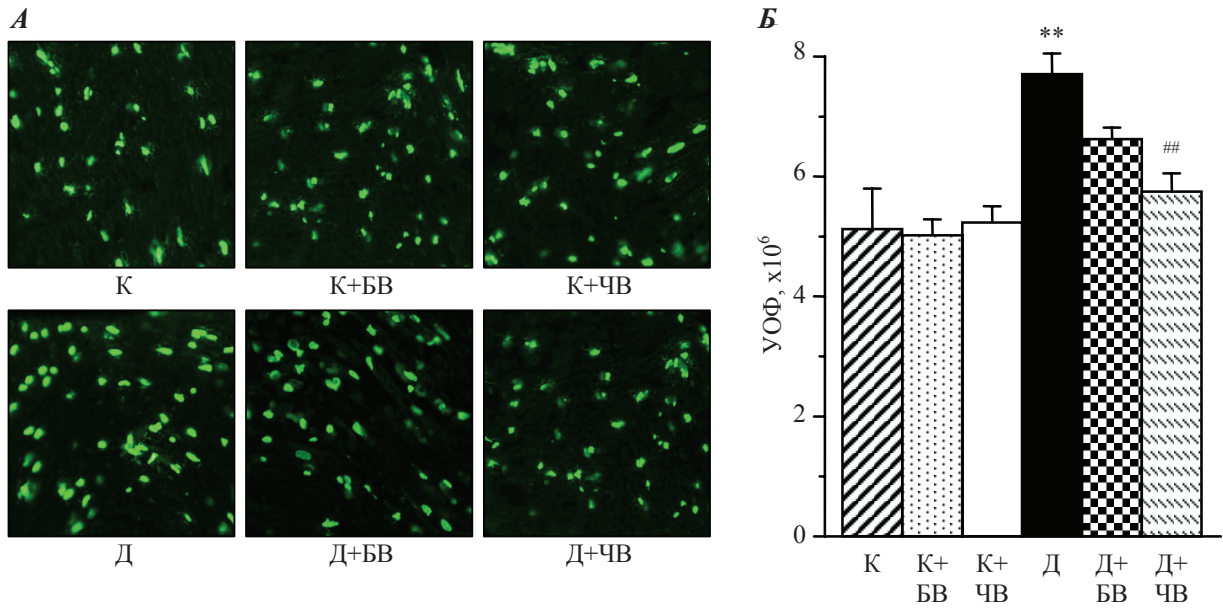


Рис. 4. Репрезентативні мікрофотографії імунофлуоресцентної мікроскопії зразків сідничного нерва щурів з використанням антитіл до полі(ADP)-рибоза (А) та флуоресценція полі(ADP)-рибозильованих протеїнів (Б), виражена в умовних одиницях флуоресценції (УОФ) з допомогою програми ImageJ. К – контроль; Д – діабет; БВ – біле вино; ЧВ – червоне вино. Збільшення $\times 100$ ($M \pm m$, $n = 5-7$), ** $P < 0,01$, проти контрольної групи. ## $P < 0,01$ проти групи щурів, хворих на діабет, що додатково не споживали вина

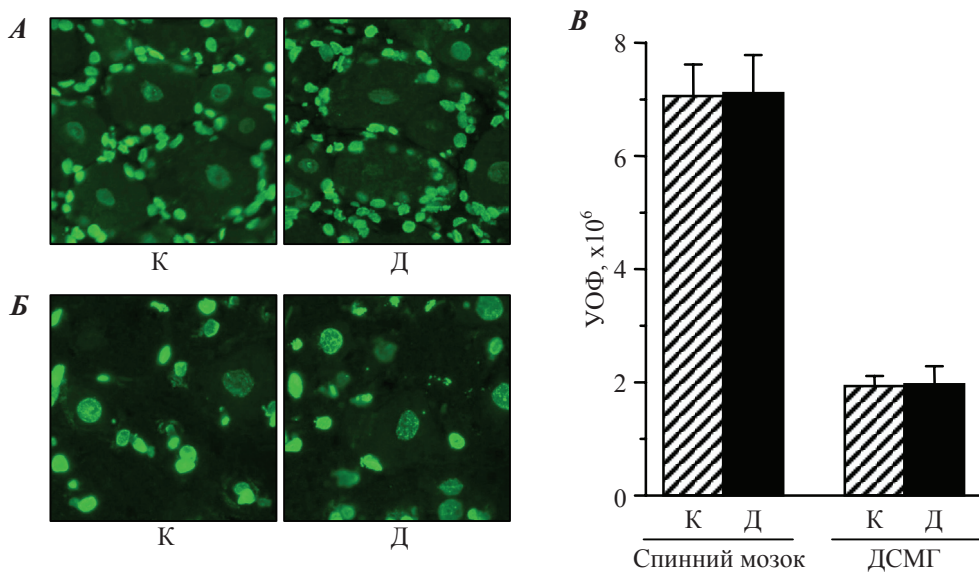


Рис. 5. Репрезентативні мікрофотографії імунофлуоресцентної мікроскопії зразків ДСМГ (А) і сірої речовини спинного мозку на рівні поперекового відділу (задні роги) (Б) щурів із використанням антитіл до полі(ADP)-рибоза та флуоресценція полі(ADP)-рибозильованих протеїнів (В), виражена в умовних одиницях флуоресценції (УОФ) з допомогою програми ImageJ. К – контроль; Д – діабет. Збільшення $\times 100$ ($M \pm m$, $n = 5-7$)

спинномозкових гангліях та спинному мозку, для яких показники імунофлуоресценції значно не відрізняється між собою (рис. 5, А, Б). Це підтвердило та розширило можливість

трактування попередніх досліджень, в яких було показано, що структурновідмінні інгібітори PARP-1 відновлювали провідність як моторних, так і сенсорних нервів, нівелювали

явища нейроваскулярних дисфункцій, відновлювали енергетичне забезпечення периферичної нервової системи, а також знімали прояви сенсорних нейропатій в щурів із 4-тижневим діабетом [17]. Тому активація PARP-1 в сідничному нерві та відсутність такої у ДСМГ та спинному мозку свідчить про роль цього ензиму в розвитку саме ранніх нейропатій периферичної нервової системи при діабеті. Здатність червоного вина проявляти інгібуючу дію на PARP-1 може свідчити про його потенційну можливість запобігати розвитку ранніх нейропатій при цукровому діабеті.

Таким чином, наші дослідження підтверджують гіпотезу про те, що оксидативно-нітрозативний стрес проявляється вже на ранніх етапах розвитку цукрового діабету, про що свідчить накопичення нітротирозину, одного із ранніх маркерів даного процесу в сідничному нерві, дорсально спинномозкових гангліях та спинному мозку. Активація PARP-1 у сідничному нерві також може бути раннім тестовим показником розвитку нейропатій, поряд із накопиченням нітротирозину. Здатність червоного вина запобігати накопиченню нітротирозину та полі-(ADP)-рибозильованих протеїнів, а також позитивно впливати на зростання маси тіла діабетичних тварин протягом експерименту, може бути доказом його протекторної дії. Виявлений нами протекторний ефект червоного вина на досліджувані показники найімовірніше здійснюється за рахунок поліфенолів, які містяться в ньому. Проведені дослідження свідчать про перспективність застосування червоних вин під час лікування ускладнень цукрового діабету та при створенні нових препаратів на їхній основі.

ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ВИНОГРАДНЫХ ВИН ПРИ НИТРОЗАТИВНОМ СТРЕССЕ, ВЫЗВАННОМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

*В. Р. Дрель¹, А. Р. Гнатуш¹,
А. Я. Яланецкий², В. Г. Гержижикова²,
В. И. Мизин², В. А. Загоруйко²,
Н. А. Сибирная¹*

¹Львовский национальный университет
им. Ивана Франко, Украина;
e-mail: sybirna_natalia@yahoo.com;

²Национальный институт винограда и
вина “Магарач”, Ялта, Украина

Установлено, что в условиях оксидативно-нитрозативного стресса, вызванном сахарным диабетом, красное и белое виноградные вина, полифенолы которых считаются основными действующими веществами, снижают уровень нитротирозинмодифицированных протеинов до уровня контроля в седалищном нерве, дорсальных спинномозговых ганглиях и спинном мозге крыс. Показано также снижение активности поли(ADP-рибозо)полимеразы-1 до уровня контроля в седалищном нерве диабетических крыс, которым давали красное вино. В течение эксперимента обнаружено увеличение массы тела в контрольной и в группах крыс, больных сахарным диабетом, которым давали красное вино на 52 и 19% соответственно.

Полученные результаты обосновывают целесообразность применения красных вин и возможность создания на их основе препаратов для профилактики и лечения нейропатий при сахарном диабете.

Ключевые слова: сахарный диабет, оксидативно-нитрозативный стресс, красное и белое вина, периферическая нервная система.

PROTECTIVE EFFECT OF GRAPE WINE UNDER EXPERIMENTAL NITROSATIVE DIABETES-ASSOCIATED OXIDATIVE STRESS

V. R. Drel¹, A. R. Gnatush¹,
A. Ya. Yalanecky², V. G. Gerzhykova²,
V. I. Mizin², V. A. Zagoruyko², N. O. Sybirna¹

¹Ivan Franko National University of Lviv, Ukraine;
e-mail: sybirna_natalia@yahoo.com;

²National Institute for Vine and Wine
“Magarach”, Yalta, Ukraine

S u m m a r y

It was found that under the diabetes-induced oxidative-nitrosative stress, red and white wines, which polyphenols are considered to be the main active components, decrease the level of nitrotyrosine-modified proteins toward the control level in sciatic nerve, dorsal root ganglia and spinal cord of animals with diabetes mellitus. A decrease of the activity of poly(ADP-ribose)polymerase-1 to the control level in the sciatic nerve of diabetic rats with red wine consumption was also shown. During the experiment the body weight of the control group and diabetic groups of rats with consumption of red wine was significantly increased by 52% and 19% accordingly.

The present results allow us to assume an important role of red wine and possibility of production of its preparations for prevention and treatment of diabetic neuropathy.

Key words: diabetes mellitus, oxidative-nitrosative stress, red and white wines, peripheral nervous system.

1. King H., Aubert R. E., Herman W. H. // *Diabetes Care*. – 1998. – **21**, N 9. – P. 1414–1431.
2. Brownlee M. // *Diabetes*. – 2005. – **54**, N 6. – P. 1615–1625.
3. Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L. // *Physiol. Rev.* – 2007. – **87**, N 1. – P. 315–424.
4. Drel V. R., Pacher P., Stevens M. J., Obrosova I. G. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2006. – **40**, N 8. – P. 1454–1465.
5. Economides P. A., Khaodhiar L., Caselli A. et al. // *Diabetes*. – 2005. – **54**, N 1. – P. 204–211.
6. Marfella R., Cacciapuoti F., Siniscalchi M. et al. // *Diabet. Med.* – 2006. – **23**, N 9. – P. 974–981.
7. Montilla P., Barcos M., Munoz M. C. et al. // *J. Biochem. Mol. Biol.* – 2005. – **38**, N 5. – P. 539–544.
8. Peterson G. L. // *Anal. Biochem.* – 1977. – **83**, N 2. – P. 346–356.
9. Laemmli U. K. // *Nature*. – 1970. – **227**, N 5259. – P. 680–684.
10. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // *Biotechnology*. – 1992. – **24**. – P. 145–149.
11. Drel V. R., Pacher P., Vareniuk I. et al. // *Eur. J. Pharmacol.* – 2007. – **569**, N 1–2. – P. 48–58.
12. Palsamy P., Subramanian S. // *Biomed. Pharmacother.* – 2008. – **62**, N 9. – P. 598–560.
13. Gouni-Berthold I., Krone W. // *Med. Klin. (Munich)*. – 2006. – **101** (Suppl 1). – P. 100–105.
14. Kitabchi A. E., Umpierrez G. E., Fisher J. N. et al. // *J. Clin. Endocrin. Metab.* – 2008. – **93**, N 5. – P. 1541–1552.
15. Ceriello A. // *Int. J. Clin. Pract. Suppl.* – 2002. – **129**. – P. 51–58.
16. Coppey L. J., Gellett J. S., Davidson E. P. et al. // *Br. J. Pharmacol.* – 2001. – **134**, N 1. – P. 21–29.
17. Obrosova I. G., Drel V. R., Oltman C. L. et al. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2007. – **293**. – P. E1645–E1655.
18. Obrosova I. G., Xu W., Lyzogubov V. V. et al. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2008. – **44**, N. 6. – P. 972–981.
19. Ziegler D., Sohr C. G., Nourooz-Zadeh J. // *Diabetes Care*. – 2004. – **27**. – P. 2178–2183.
20. Dobretsov M., Romanovsky D., Stimers J. R. // *World J. Gastroenterol.* – 2007. – **13**, N 2. – P. 175–191.

Отримано 22.10.2009