

УДК 616.379-008.64:616.16:616.15

І. В. Савицький, д-р мед. наук, проф.,
В. І. Величко, д-р мед. наук, проф.,
Н. І. Прейс, канд. мед. наук,
Я. В. Сірман, канд. мед. наук,
В. М. Сарахан

ОСОБЛИВОСТІ СИСТЕМИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ТА ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ПРИ МІКРОАНГІОПАТІЯХ НА ТЛІ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2 ТИПУ

Український НДІ медицини транспорту МОЗ України, Одеса, Україна

УДК 616.379-008.64:616.16:616.15

І. В. Савицький, В. І. Величко, Н. І. Прейс, Я. В. Сірман, В. М. Сарахан
ОСОБЛИВОСТІ СИСТЕМИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ
ТА ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ПРИ МІКРОАНГІОПАТІЯХ
НА ТЛІ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2 ТИПУ

Український НДІ медицини транспорту МОЗ України, Одеса, Україна

У статті подано результати експериментального дослідження антиоксидантної системи (АОС) та перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у тварин з модельованими ускладненнями мікроциркуляторного русла (діабетична ретинопатія (ДР), діабетична нефропатія (ДН)) на тлі цукрового діабету (ЦД) 2 типу. Установлено, що у групі тварин із ЦД 2 типу підвищувався рівень дієнових кон'югатів, ТБК-продуктів і малонового діальдегіду; рівень каталази та відновленого глутатіону знижувалися. У тварин з модельованою ДН порушення АОС було більш вираженим порівняно з тваринами з ДР. Дану тенденцію можна пояснити тим, що, окрім гіперглікемії, у даних тварин надлишкове утворення вільних радикалів сприяє метаболічним зсувам в ішемізованих зонах тканин та органів. Порушення балансу в АОС і ПОЛ при ЦД 2 типу запускає патогенетичний каскад розвитку ускладнень мікроциркуляторного русла та супроводжується тенденцією до ще більшого посилення генерації активних форм кисню й активації ПОЛ при мікроангіопатіях.

Ключові слова: антиоксидантна система, цукровий діабет, діабетична ретинопатія, діабетична нефропатія, перекисне окиснення ліпідів.

UDC 616.379-008.64:616.16:616.15

I. V. Savitskyi, V. I. Velychko, N. I. Preis, Ya. V. Sirman, V. M. Sarakhan
FEATURES OF THE SYSTEM OF ANTIOXIDANT PROTECTION AND
LIPID PEROXIDATION IN MICROANGIOPATHIES AGAINST A BACKGROUND OF
TYPE 2 DIABETES MELLITUS

Ukrainian RI of Transport Medicine MH of Ukraine, Odesa, Ukraine

The article presents the results of an experimental study of the AOP and LPO system in animals with simulated complications of the microcirculatory tract (diabetic retinopathy, diabetic nephropathy) on the background of type 2 diabetes. It was found that the group of animals with type 2 diabetes has increased the level of DC, TBC-products and MDA; catalase and RG levels decreased. In animals with simulated DN, AOP disorders were more pronounced compared to animals with DR. This trend can be explained by the fact that in addition to hyperglycemia in these animals, the excessive formation of free radicals contributes to metabolic shifts in ischemic areas of tissues and organs. Disturbance of balance in AOP and LPO in type 2 diabetes triggers a pathogenetic cascade of development of complications of the microcirculatory tract and is accompanied by a tendency to further increase the generation of reactive oxygen species and activation of POL in microangiopathies.

Key words: antioxidant system, diabetes mellitus, diabetic retinopathy, diabetic nephropathy, lipid peroxidation.

Вступ

Захворюваність на цукровий діабет (ЦД) і його поширеність прогресивно зростають у всіх країнах світу, незважаючи на значні досягнення в діабетології та величезні кошти, вкладені урядами різних країн у наукові дослідження, присвячені проблемі ЦД, його профілактиці та ускладненням. За прогнозами експертів Міжнародної федерації діабету, кількість хворих на ЦД 2 типу

до 2025 р. сягатиме близько 380 млн осіб [8]. Основною причиною летальності при ЦД 2 типу є макро- та мікросудинні ускладнення, причиною яких вважають гіперглікемію, що є таким же фактором ризику розвитку атеросклерозу і серцево-судинної летальності, як і рівень загального холестерину й артеріального тиску [9].

Однією з найважливіших ланок у патогенезі ЦД 2 типу та його ускладнень вважається окисний стрес і його прямий наслідок — інтенсифікація перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). Доведено, що ЦД 2 типу — це вільнорадикальна патологія. Актуальність і необхідність прогнозу-

© І. В. Савицький, В. І. Величко, Н. І. Прейс, Я. В. Сірман, В. М. Сарахан, 2019

вання порушень у системі антиоксидантного захисту зумовлена також тим, що каскад вільнорадикальних реакцій запускається ще до клінічної маніфестації ЦД 2 типу й у перші роки захворювання [4]. Навіть у пацієнтів з уперше діагностованим ЦД 2 типу вже присутня активація окисного стресу. Вона проявляється підвищенням окисної модифікації біологічних молекул та інтенсифікацією ПОЛ. Ступінь вираженості окисного стресу тісно пов'язаний з ослабленням ферментативної антиоксидантної системи (АОС), тривалістю захворювання та ступенем декомпенсації вуглеводного обміну [8].

Окисний стрес лежить в основі розвитку багатьох пізніх ускладнень ЦД 2 типу, зокрема мікро- і макроангіопатій та нейропатій. Тимчасом значущість гіперглікемії в ініціації та потенціюванні генерації активних форм кисню доведена як на експериментальних моделях, так і в клінічних дослідженнях [12].

Окисний стрес як дисбаланс між інтенсивністю утворення активних форм кисню, перекису водню і вільних радикалів, з одного боку, й активністю АОС — з другого, відіграє важливу роль у патогенезі ускладнень при ЦД 2 типу. Проте залишається відкритим питання щодо впливу тривалості захворювання та пізніх ускладнень на вираженість окисного стресу при ЦД 2 типу, а також чи залежить окисний стрес від ступеня компенсації обмінних порушень [13].

Мета даної роботи — оцінити параметри вільнорадикального окиснення при хронічних ускладненнях ЦД 2 типу — діабетичній ретинопатії (ДР) та діабетичній нефропатії (ДН).

Матеріали та методи дослідження

Експериментальні дослідження виконані на 24 білих нелінійних щурах-самцях масою 240–280 г, які були розподілені на чотири експериментальні групи (по 6 тварин у кожній): 1-ша група — інтактний контроль — тварини, які утримувалися на стандартному харчовому раціоні віварію; 2-га група — щури, яким відтворювали стрептозототиновий діабет [5]; 3-тя група — тварини, яким після введення стрептозототину та нікотинаміду відтворювали модель ДР [3]; 4-та група — особини, яким після введення стрептозототину та нікотинаміду відтворювали модель ДН [1].

Для відтворення ЦД 2 типу використовували стрептозототинову модель: щурам одноразово внутрішньовенно вводили стрептозототин дозою 65 мг/кг [5]. Розчин стрептозототину готували в 0,1 М цитратному буфері рН 4,5. З метою зниження діабетогенної дії стрептозототину за

15 хв до його введення внутрішньоочеревинно вводили нікотинамід дозою 230 мг/кг, за рахунок чого у тварин розвивається помірна та стабільна базальна гіперглікемія. Через 1 тиж. проводили глюкозотолерантний тест для визначення рівня глікемії натще та через 30, 60, 90 та 120 хв після внутрішньошлункового введення 40 % розчину глюкози дозою 3 г/кг та при рівні глікемії від 9,0 до 14 ммоль/л.

Відтворювали ДР шляхом введення підшкірно розчину еритропоєтину тричі на тиждень по 6 Од на 100 г маси тіла протягом 6 міс. [3].

У тварин, яким моделювали ДН, раціон базувався на високожировому раціоні харчування. На 35–40-й тиждень у тварин відзначали ознаки ДН — протеїнурію, зниження швидкості клубочкової фільтрації [1].

Окисидативний стрес оцінювали за такими показниками:

1) рівень ТБК-активних продуктів у гомогенаті печінки за реакцією з тіобарбітуровою кислотою за методом М. Uchiyama і М. Michara в модифікації І. А. Волчегорського (1989) [7];

2) вміст дієнових кон'югантів (ДК) за методом І. Д. Стальної в модифікації В. І. Скорнякова (1988) [7];

3) концентрація малонового діальдегіду (МДА) за методом І. Д. Стальної і співавт. (1987) [11];

4) вміст каталази за методом М. А. Гаврилюка (1988) [7].

Стан системи антиоксидантного захисту характеризували за вмістом відновленого глутатіону (ВГ) у гомогенаті печінки, який визначали спектрофотометрично за реакцією з реактивом Елмана [7].

При роботі з тваринами дотримувалися Міжнародного кодексу медичної етики (Венеція, 1983), «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальними та іншими науковими цілями» (Страсбург, 1986), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), Directive 2010/63/EU of European Parliament and Council on the protection of animals used for scientific purposes, закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 440-IX від 14.01.2020 р. [10].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою програми "Statistica 8.0". Вірогідність відмінностей між показниками контрольної та дослідних груп визначали за критеріями Стьюдента і Фішера. Рівень вірогідності приймали при $p < 0,05$ [6].

Результати дослідження та їх обговорення

Відомо, що хронічна гіперглікемія призводить до розвитку оксидативного стресу завдяки підвищеній генерації активних форм кисню в мітохондріях, неферментативному глікозилюванню білків й аутоокисненню глюкози, а підвищений рівень вільних жирних кислот, що виникає внаслідок інсулінорезистентності, — завдяки мітохондріальній дисфункції, b-окисненню в пероксисомах і ліпопероксидації [4].

У тварин групи контрольної патології спостерігалось достовірне підвищення вмісту ДК на 47,4 % ($p < 0,05$) у гомогенаті печінки порівняно з тваринами інтактного контролю, що вказувало на окисні ушкодження ліпідів мембран гепатоцитів, оскільки вищезазначені сполуки є проміжними та кінцевими продуктами ПОЛ відповідно (рис. 1 і 2).

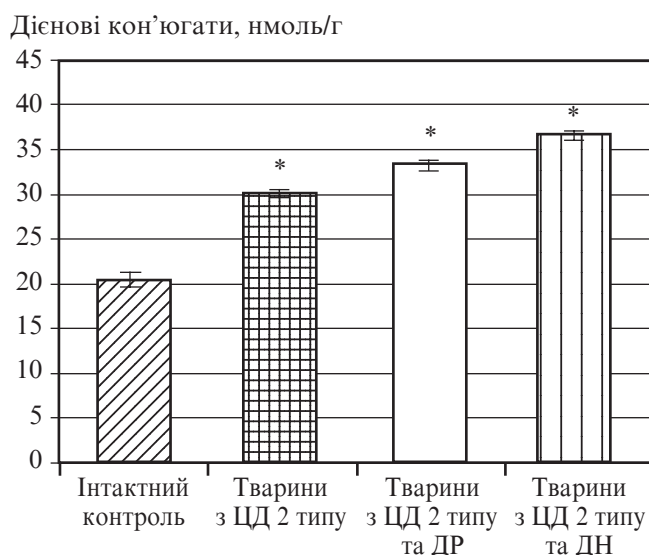


Рис. 1. Вміст дієнових кон'югантів у щурів з мікросудинними ускладненнями на тлі цукрового діабету 2 типу. На рис. 1, 2: $p < 0,05$ щодо показників інтактної групи тварин

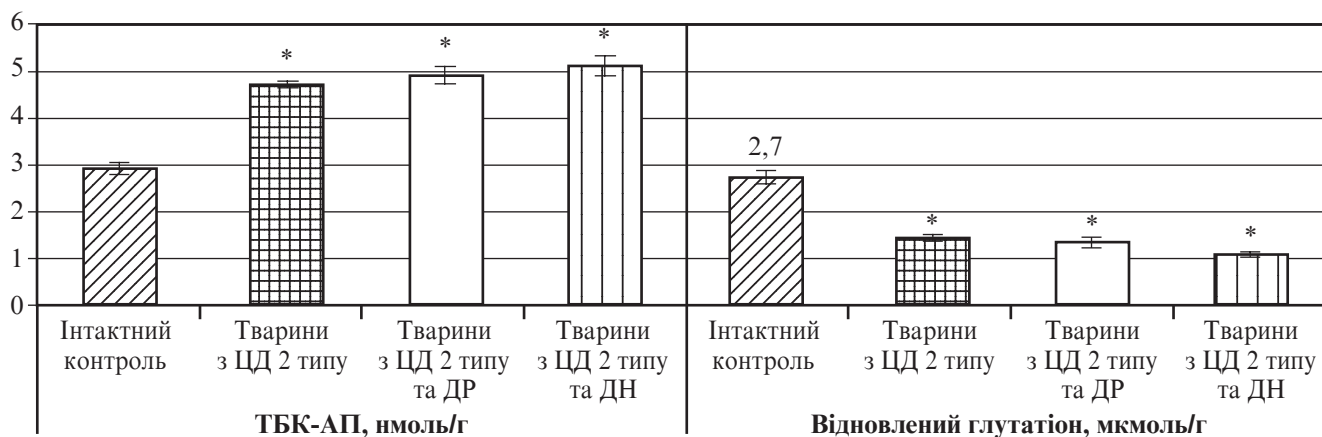


Рис. 2. Вміст ТБК-активних продуктів та відновленого глутатіону у щурів з мікросудинними ускладненнями на тлі цукрового діабету 2 типу

Також спостерігалось збільшення ДК у тварин, яким моделювали ДР і ДН. Їхній вміст був вищим в 1,7 разу ($p < 0,05$) та 1,8 разу ($p < 0,05$) порівняно з групою інтактних щурів.

У групі тварин контрольної патології встановлено підвищення вмісту ТБК-реактивів у 1,6 разу ($p < 0,05$) порівняно з тваринами інтактного контролю. У тварин із ДР даний показник підвищувався в 1,7 разу ($p < 0,05$), а у тварин із ДН — в 1,8 разу ($p < 0,05$) порівняно з інтактними тваринами.

Разом із тим розвиток ЦД 2 типу корелював із виснаженням антиоксидантного захисту, про що свідчило зниження вмісту ВГ удвічі у тварин із ЦД 2 типу ($p < 0,05$); у 2,1 разу у тварин із ЦД 2 типу та ДР ($p < 0,05$); у 2,6 разу у тварин із ЦД 2 типу та ДН ($p < 0,05$) щодо групи інтактних тварин.

Функціональну основу антиоксидантного захисту формує глутатіонова система, до складу якої входить власне глутатіон та ензими, які каталізують реакції його зворотного перетворення. Відновлений глутатіон — центральний компонент АОС, основний сірковмісний антиоксидант, який захищає сульфгідрильні групи глобіну, мембрани еритроцитів, двовалентне залізо від дії окиснювачів [2].

При вивченні показників МДА встановлено, що його рівень також змінювався. У групі тварин із ЦД 2 типу вміст МДА був вищим у 3,6 разу ($p < 0,05$); у тварин із ДР — у 4,1 разу ($p < 0,05$); у тварин із ДН — у 4,4 разу ($p < 0,05$) щодо аналогічного показника у групі тварин інтактного контролю (табл. 1).

Рівень каталази у щурів із ЦД 2 типу знижувався в 1,4 разу ($p < 0,05$); у тварин із ДР — в 1,6 разу ($p < 0,05$); у тварин із ДН — в 1,9 разу ($p < 0,05$) порівняно з групою інтактних тварин.

Отже, надлишкова генерація вільних радикалів призводить до розвитку дисфункції ендоте-

Таблиця 1

Вивчення деяких показників антиоксидантно-прооксидантної рівноваги при діабетичній ретинопатії та діабетичній нефропатії на тлі цукрового діабету 2 типу, $X \pm Sx$, $n=6$

Група спостереження	Показник	
	МДА, мкмоль/л	Каталаза, ммоль/л
Інтактний контроль	4,0±0,2	0,300±0,003
Тварини з експериментальним ЦД 2 типу	14,2±0,5*	0,220±0,015*
Тварини з експериментальною ДР	16,4±1,0*	0,190±0,017*
Тварини з експериментальною ДН	17,6±1,1*	0,160±0,012*

Примітка. $p < 0,05$ щодо показників інтактної групи тварин.

лію, модифікації ліпопротеїнів, гіперв'язкості та гіперкоагуляції. У даному випадку можна стверджувати, що порушення балансу в АОС і ПОЛ при ЦД 2 типу запускає патогенетичний каскад розвитку ускладнень мікроциркуляторного русла та супроводжується тенденцією до ще більшого посилення генерації активних форм кисню й активації ПОЛ.

Варто зазначити, що є тенденція до більш вираженого окисного стресу у щурів із ускладненнями ЦД 2 типу. Окрім цього, у тварин з модельованою ДН порушення АОС було більш вираженим порівняно з тваринами з ДР. Дану тенденцію можна пояснити тим, що, окрім гіперглікемії, у даних тварин надлишкове утворення вільних радикалів сприяє метаболічним зсувам в ішемізованих зонах тканин та органів.

Висновки

1. При вивченні показників АОС і ПОЛ установлено, що у групі тварин із ЦД 2 типу підвищувався рівень ДК, ТБК-продуктів і МДА; рівні каталази та ВГ знижувалися.

2. У тварин з модельованою ДН порушення АОС було більш вираженим порівняно з тваринами з ДР. Дану тенденцію можна пояснити тим, що, окрім гіперглікемії, у даних тварин надлишкове утворення вільних радикалів сприяє метаболічним зсувам в ішемізованих зонах тканин та органів.

3. Порушення балансу в АОС і ПОЛ при ЦД 2 типу запускає патогенетичний каскад розвитку ускладнень мікроциркуляторного русла та супроводжується тенденцією до ще більшого посилення генерації активних форм кисню й активації ПОЛ при мікроангіопатіях.

Ключові слова: антиоксидантна система, цукровий діабет, діабетична ретинопатія, діабетична нефропатія, перекисне окиснення ліпідів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Байрашева В. К. Моделирование сахарного диабета и диабетической нефропатии в эксперименте. *Современные проблемы науки и образования*. 2015. № 4. <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21024>
2. Біологічне значення системи антиоксидантного захисту організму тварин / Ю. Ю. Лавришин та ін. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжецького*. 2016. Т. 18, № 2 (66). С. 100–111.
3. Биомаркеры диабетической ретинопатии / М. В. Будзинская, Д. В. Липатов, В. Г. Павлов, Д. В. Петрачков. *Сахарный диабет*. 2020. № 1 (23). С. 88–94.
4. Вивчення антиоксидантних властивостей густого екстракту квасолі на моделі цукрового діабету 2 типу на тлі ожиріння в щурів / В. А. Рибак, Л. М. Малоштан, В. В. Полторак, Н. С. Красова. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2015. № 1 (42). С. 76–81.
5. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. реком. / за ред. чл.-кор. НАМН України, акад. О. В. Стефанова. К. : Авіценна, 2001. 528 с.
6. Методы статистической обработки медицинских данных : метод. реком. / А. Г. Кочетов, О. В. Лянг, И. В. Жиров и др. М. : РКНПК, 2012. 42 с.
7. Меньшиков В. В. Лабораторные методы исследования в клинике. М. : Медицина, 1987. 368 с.
8. Мокрій В. Я., Зябліцев С. В., Кришталь М. В. Особливості формування окисного стресу у хворих на цукровий діабет 2-го типу залежно від тривалості захворювання та статі. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2016. № 5 (77). С. 67–71.
9. Попова Т. Н., Агарков А. А., Веревкин А. Н. Интенсивность свободнорадикальных процессов в печени крыс при сахарном диабете 2 типа и введении эпифамина. *Экспериментальные статьи*. 2013. № 4 (19). С. 129–134.
10. Резніков О. Г., Соловійов А. І., Стефанов О. В. Біотична експертиза доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах : метод. реком. *Вісник фармакології і фармації*. 2006. № 7. С. 47–61.
11. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. *Современные методы в биохимии*. М. : Медицина, 1977. С. 66–68.
12. Diabetic microangiopathy: Pathogenetic insights and novel therapeutic approaches / R. Madonna et al. *Vascul Pharmacol*. 2017. № 90. P. 1–7.
13. Dymkowska D. Oxidative damage of the vascular endothelium in type 2 diabetes - the role of mitochondria and NAD(P)H oxidase. *Postepy Biochem*. 2016. № 62 (2). P. 116–126.

Надійшла до редакції 22.02.2019

Рецензент д-р мед. наук, проф. Р. С. Вастьянов,
дата рецензії 27.02.2019