

УДК 616.379-008.64-09

DOI: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.4396177>

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

**Савицький І.В., Грицан І.І., Сарахан В.М.**  
*Одеський міжнародний медичний університет  
Одеський національний медичний університет*

**ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ И  
ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ  
МИКРОАНГИОПАТИЯХ НА ФОНЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2  
ТИПА**

**Савицкий И.В., Грицан И.И., Сарахан В.М.**  
*Одесский международный медицинский университет  
Одесский национальный медицинский университет*

**FEATURES OF THE SYSTEM OF ANTIOXIDANT PROTECTION  
AND LIPID PEROXIDATION IN MICROANGIOPATHIES AGAINST  
TYPE 2 DIABETES MELLITUS**

**Savitsky I.V., Gritsan I.I., Sarakhan V.M.**  
*Odessa International Medical University  
Odessa National Medical University*

127

**Summary/Резюме**

The article presents the results of an experimental study of the AOP and LPO system in animals simulated complications of the microcirculatory tract (diabetic retinopathy, diabetic nephropathy) on the background of type 2 diabetes. It was found that in the group of animals with type 2 diabetes increased the level of DC, TBC-products and MDA; catalase and FG 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.*

В статье представлены результаты экспериментального исследования системы АОС и ПОЛ у животных с моделированными осложнениями микроциркулятор-

ного русла (диабетическая ретинопатия (ДР), диабетическая нефропатия (ДН)) на фоне СД 2 типа. Установлено, что в группе животных с СД 2 типа повышался уровень ДК, ТБК-продуктов и МДА; уровень каталазы и ВГ снижались. У животных с моделируемой ДН нарушения АОС были более выраженным по сравнению с животными с ДР. Данную тенденцию можно объяснить тем, что кроме гипергликемии у данных животных присутствует избыточное образование свободных радикалов, способствующее метаболическим сдвигам в ишемизированных зонах тканей и органов. Нарушение баланса в АОС и ПОЛ при СД 2 типа запускает патогенетический каскад развития осложнений микроциркуляторного русла и сопровождается тенденцией к еще большему усилению генерации активных форм кислорода и активации ПОЛ при микроангиопатиях.

**Ключевые слова:** антиоксидантная система, сахарный диабет, диабетическая ретинопатия, диабетическая нефропатия, перекисное окисление липидов.

В статі представлені результати експериментального дослідження системи АОС (антиоксидантної системи) та ПОЛ (перекисного окиснення ліпідів) у тварин змодельованими ускладненнями мікроциркуляторного русла (діабетична ретинопатія, діабетична нефропатія) на тлі цукрового діабету (ЦД) 2 типу. Встановлено, що у групі тварин з ЦД 2 типу підвищувався рівень дієнових кон'югатів (ДК), ТБК-продуктів та малонового діальдегіду (МДА); рівень каталази та ВГ знижувалися. У тварин з модельованою діабетичною нефропатією (ДН) порушення АОС було більш вираженим порівняно із тваринами з діабетичною ретинопатією (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 та ПОЛ при ЦД 2 типу запускає патогенетичний каскад розвитку ускладнень мікроциркуляторного русла та супроводжується тенденцією до ще більшого посилення генерації активних форм кисню і активації ПОЛ при мікроангіопатіях.

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

### Вступ

Захворюваність на цукровий діабет (ЦД) і його поширеність прогресивно збільшується у всіх країнах світу, незважаючи на значні досягнення в діабетології і величезні кошти, вкладені урядами різних країн в наукові дослідження, присвячені проблемі ЦД, його профілактиці та ускладненням. За прогнозами експертів Міжнародної Федерації діабету кількість хворих на ЦД 2 типу до 2025 року буде сягати близько 380 млн. осіб [8]. Основною причиною летальності при ЦД 2 типу є макро- і мікросудинні ускладнення, причиною яких вважають гіперглікемію, що є таким же фактором

ризиком розвитку атеросклерозу і серцево-судинної летальності, як і рівень загального холестерину і артеріального тиску [9].

Однією з найважливіших ланок у патогенезі ЦД 2 типу та його ускладнень вважається окисний стрес та його прямий наслідок – інтенсифікація перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). Доведено, що ЦД 2-го типу – це вільно-радикальна патологія. Актуальність та необхідність прогнозування порушень у системі антиоксидантного захисту обумовлена також тим, що каскад вільно-радикальних реакцій запускається ще до клінічної маніфестації ЦД 2 типу та в

перші роки захворювання [4]. Навіть у пацієнтів з уперше діагностованим ЦД 2-го типу вже присутня активація окисного стресу. Вона проявляється підвищенням окисної модифікації біологічних молекул та інтенсифікацією ПОЛ. Ступінь вираженості окисного стресу тісно пов'язаний з послабленням 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- та макроангіопатій та нейропатій. При цьому 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, та активністю АОС – з іншого, відіграє важливу роль у патогенезі ускладнень при ЦД 2-го типу. Однак, залишається відкритим питанням 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, 14].

**Мета даної роботи** – оцінити параметри вільно-радикального окиснення при хронічних ускладненнях (діабетичній ретинопатії (ДР) та діабетичній нефропатії (ДН) ЦД 2-го типу.

#### **Матеріали та методи дослідження**

Експериментальні дослідження виконані на 24 білих нелінійних щурах-самцях масою 240-280 г, які були розподілені на 4 експериментальні групи (по 6 тварин в кожній):

1 група – інтактний контроль – тварини, які утримувались на стандартному

харчовому раціоні віварію; 2 група – тварини, яким відтворювали стрептозотоциновий діабет [5]; 3 група – тварини, яким після введення стрептозотоцину та нікотинаміду відтворювали модель ДР [3]; 4 група – тварини, яким після введення стрептозотоцину та нікотинаміду відтворювали модель ДН [1].

Для відтворення ЦД 2 типу використовували стрептозотоцинову модель: щурам одноразово внутрішньовенно вводили стрептозотоцину дозою 65 мг/кг [5]. Розчин стрептозотоцину готували в 0,1 М цитратному буфері рН 4,5. З метою зниження діабетогенної дії стрептозотоцину за 15 хвилин до його введення, внутрішньоочеревинно вводили нікотинамід дозою 230 мг/кг, за рахунок чого у тварин розвивається помірна та стабільна базальна гіперглікемія. Через 1 тиждень проводили глюкозолерантний 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 рівні глікемії від 9,0 до 14 ммоль/л.

ДР відтворювали шляхом введення підшкірно розчину еритропоетину тричі на тиждень по 6 Од на 100 г маси тіла протягом 6 місяців [3].

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

Оксидативний стрес оцінювали за наступними показниками: 1) рівень ТБК-активних продуктів у гомогенаті печінки за реакцією з тіобарбітуровою кислотою за методом Uchiyama M. & Michara M. в модифікації Волчегорського І. А. (1989 р.) [7]; 2) вміст дієнових кон'югатів (ДК) за методом Стальної І.Д. в модифікації Скорнякова В.І. (1988 р.) [7]; 3) концентрація малонового діальдегіду (МДА) за

методом Стальної І. Д. та співавт. (1987) [11]; 4) вміст каталази за методом Гаврилюк М. А. (1988) [7].

Стан антиоксидантної системи 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 одержаних результатів проводили за допомогою програми «Statistica 8.0». Вірогідність відмінностей між показниками контрольної та дослідних груп визначали за критеріями Стьюдента та Фішера. Рівень достовірності приймали при  $p < 0,05$  [6].

### Результати та їх обговорення

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

У тварин групи КП 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, рис. 2).

Також відмічався ріст ДК у тварин, яким моделювали ДР та ДН. Їх вміст був вище в 1,7 разів ( $p < 0,05$ ) та в 1,8 разів ( $p < 0,05$ ) порівняно із групою інтактних щурів.

У групі тварин контрольної патології встановлено підвищення вмісту

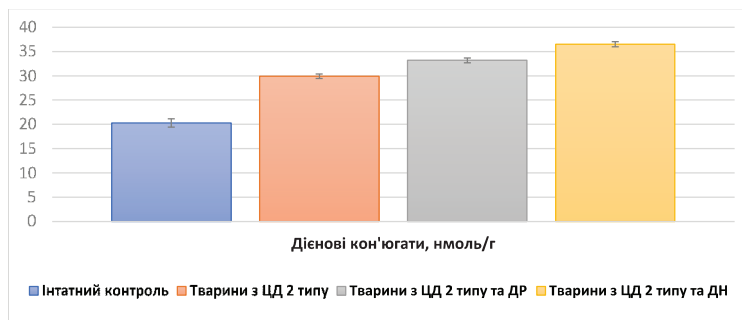


Рис. 1. Вміст ДК у щурів з мікросудинними ускладненнями на тлі цукрового діабету 2 типу

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

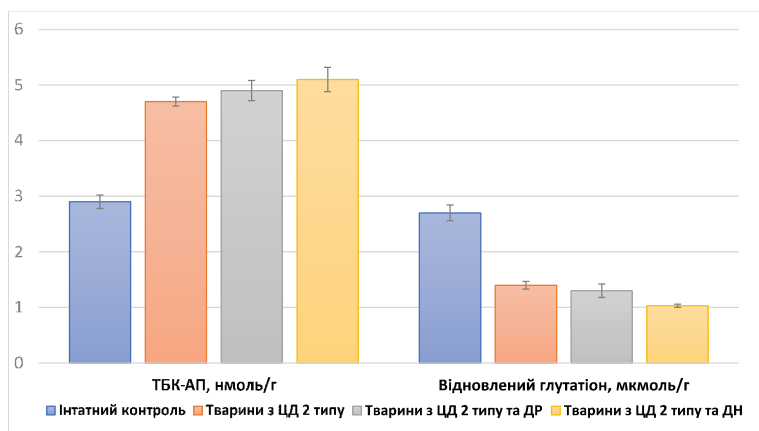


Рис. 2. Вміст ТБК-АП та ВГ у щурів з мікросудинними ускладненнями на тлі цукрового діабету 2 типу

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

Таблиця групою інтакт-

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

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

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

ТБК-реактивів в 1,6 разів ( $p < 0,05$ ) порівняно з тваринами інтактного контролю. У тварин з ДР даний показник підвищувався в 1,7 разів ( $p < 0,05$ ), а у тварин з ДН – в 1,8 разів ( $p < 0,05$ ) порівняно з інтактними тваринами.

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

Функціональну основу антиоксидантного захисту формує глутатіонова система, до складу якої входить власне глутатіон та ензими, які каталізують реакції його зворотного перетворення. ВГ – 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. В групі тварин з ЦД типу вміст МДА був вище в 3,6 разів ( $p < 0,05$ ); у тварин з ДР – в 4,1 рази ( $p < 0,05$ ); у тварин з ДН – в 4,4 рази ( $p < 0,05$ ) відносно аналогічного показника у групі тварин інтактного контролю (табл.).

Рівень каталази у щурів з ЦД 2 типу знижувався в 1,4 рази ( $p < 0,05$ ); у тварин з ДР – в 1,6 разів ( $p < 0,05$ ); у тварин з ДН – в 1,9 разів ( $p < 0,05$ ) порівняно із

них тварин.

О т ж е , надлишкова генерація вільних радикалів призводить до розвитку дисфункції ендотелію, модифікації ліпопротеїнів,

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

Варто відмітити тенденцію 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 із 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 та ПОЛ встановлено, що у групі тварин з ЦД 2 типу підвищувався рівень ДК, ТБК-продуктів та МДА; рівень каталаза та ВГ знижувалися.
2. У тварин з модельованою ДН порушення АОС було більш вираженим порівняно із 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 та ПОЛ

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

### 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. Гжицького*. 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. Малюштан, В. В. Полторак, Н. С. Красова // *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2015. № 1 (42). С. 76–81.
5. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рек. / за ред. чл.-кор. НАМН України, акад. О. В. Стефанова. К.: Авіценна, 2001. 528 с.
6. Методы статистической обработки медицинских данных: метод. рек. / 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., Зяблицев 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., Вережкин А. Н. Интенсивность свободно-радикальных 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. рекомендації. *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.
14. Gozhenko A I. Advantages of high olein sunflower oil over palm oil according to biochemical research results / A I. Gozhenko, A P. Levitsky, V. T. Stepan, I. P. Pustovoit, N. S. Badiuk, A. K. Maslyukov - PhOL – PharmacologyOnLine - N 2. - P. 293-301. [https://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2020/vol2/PhOL\\_2020\\_2\\_A028\\_Gozhenko.pdf](https://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2020/vol2/PhOL_2020_2_A028_Gozhenko.pdf)

### References

1. Bayrasheva VK Modeling of diabetes mellitus and diabetic nephropathy in experiment. *Modern problems of science and education*. 2015. No. 4. <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21024>
2. Biological significance of the system of antioxidant protection of the animal body / Yu. Yu. Lavryshyn et al. *Scientific Bulletin of LNUVMBT named after SZ Gzhytsky*. 2016. T. 18, № 2 (66). Pp. 100–111.
3. Biomarkers of diabetic retinopathy / M. V. Budzinskaya, D. V. Lipatov, V. G. Pavlov, D. V. Petrachkov // *Diabetes mellitus*. 2020. No. 1 (23). S. 88–94.
4. V.A Rybak, L.M. Maloshtan, V.V. Poltorak, N.S. Krasova // *Pharmacology and drug toxicology*. 2015. № 1 (42). Pp. 76–81.
5. Preclinical studies of drugs: a method. rivers / for ed. Corresponding Member NAMS of Ukraine, acad. O.V. Stefanova. Avicenna, 2001.528 p.
6. Methods of statistical processing of medical data: method. rivers. / AG. Kochetov, O. V. Lyang, I. V. Zhironov et al. M.: RKNPK, 2012.42 p.
7. Menshikov V.V. Laboratory research methods

- in the clinic. М.: Medicine, 1987. 368 p.
8. Mokriy V.Ya., Zyablitsev S.V., Kryshchal M.V. Peculiarities of oxidative stress formation in patients with type 2 diabetes mellitus depending on the duration of the disease and sex. *International Journal of Endocrinology*. 2016. № 5 (77). P. 67–71.
  9. Popova TN, Agarkov AA, Verevkin AN Intensity of free radical processes in the liver of rats with type 2 diabetes mellitus and the introduction of epiphamine. *Experimental articles*. 2013. No. 4 (19). S. 129-134.
  10. Reznikov O.G., Solovyov A.I., Stefanov O.V. Biotic examination of preclinical and other scientific studies performed on animals: a method. recommendations. *Bulletin of Pharmacology and Pharmacy*. 2006. № 7. S. 47–61.
  11. Stalnaya ID, Garishvili TG Method for the determination of malonic dialdehyde using thiobarbituric acid. *Modern methods in biochemistry*. М.: Medicine, 1977. P. 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.
  14. Gozhenko A. I. Advantages of high olein sunflower oil over palm oil according to biochemical research results / A. I. Gozhenko, A. P. Levitsky, V. T. Stepan, I. P. Pustovoi, N. S. Badiuk, A. K. Maslyukov - *PhOL – PharmacologyOnLine* - N 2. - P. 293-301. [https://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2020/vol2/PhOL\\_2020\\_2\\_A028\\_Gozhenko.pdf](https://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2020/vol2/PhOL_2020_2_A028_Gozhenko.pdf)

*Впервые поступила в редакцию 09.09.2020 г.  
Рекомендована к печати на заседании  
редакционной коллегии после рецензирования*