

cheeks tissues following the implantation of medical steel clips can be observed from the 7<sup>th</sup> to 60<sup>th</sup> days. Thus, we can suggest that the damaging effect of medical steel clips on tongue and cheek tissues in the test animal promotes purulent inflammation. The rabbits with implanted clips in the tongue and cheek had broad wound channels, containing purulent exudates, inflammatory infiltrates were found in the walls of the wound channel. During the experiment, the histological specimens of the cheeks and tongue showed a large amount of granulation tissue, signs of immaturity and secondary inflammation, slow transformation of granulation tissue into the connective tissue that causes a lack of complete epithelisation and promotes deep skin wounds. The impairment of nerve endings in the form of oedema of the endo- and perineuria as a consequence of the implantation of medical steel clips can be manifested by persistent pain syndrome, loss of local sensitivity and distortion of taste sensation. In future, we are planning to investigate the dynamics of the wound healing after intraoral implantation of clips made of other materials in the test animals.

DOI 10.31718/2077-1096.19.3.161

УДК 616.379-008.64:617.735

Сірман Я.В., Савицький І.В.

## ПАТОГЕНЕЗ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ ПРИ ДІАБЕТИЧНІЙ РЕТИНОПАТІЇ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

ДП «Український науково-дослідний інститут медицини транспорту МОЗ України», м. Одеса  
Одеський національний медичний університет

*Одним з основних ускладнень цукрового діабету, який може призвести до інвалідизації хворих є діабетична ретинопатія. Мета: дослідження маркерів дисфункції ендотелію при експериментальній діабетичній ретинопатії. Матеріали та методи дослідження: Експеримент проведено на щурах самцях лінії Вістар, масою 180-220 грам, віком до 3-х місяців включно. В ході експерименту тварини були розподілені на дві групи: 1-а група – 20 інтактних тварин; 2-а група – 60 тварин зі змодельованим цукровим діабетом та непроліферативною діабетичною ретинопатією. Результати дослідження. При дослідженні ендотеліальної синтази оксиду азоту отримані наступні дані: виявлені дуже високо значущі відмінності ( $p < 0,001$ ) при порівнянні результатів групи №2, в якій тваринам моделювали діабетичну ретинопатію без корекції у порівнянні з даними інтактних тварин. Встановлене зменшення активності даного показника. Для більш детального вивчення функціонального стану ендотелію та його порушення нами був обраний фактор Віллебранда – один із загальноприйнятих маркерів пошкодження функціонального стану ендотелію. У групі зі змодельованою патологією встановлене підвищення рівня досліджуваного маркера у порівнянні з даними інтактних тварин ( $p < 0,001$ ). У лабораторних щурів, в яких моделювали діабетичну ретинопатію, встановлено підвищення рівня ендотеліну-1 (статистичні відмінності виявлені на рівні значущості  $p < 0,001$ ). Висновки. Доведено, що розроблена нами експериментальна модель цукрового діабету та її ускладнення у вигляді діабетичної ретинопатії супроводжується розвитком ендотеліальної дисфункції. Встановлено збільшення рівня фактора Віллебранда в умовах змодельованого патологічного процесу. Також через 30 днів від початку експерименту виявлене підвищення ендотеліну-1 – маркера вазоконстрикції та ендотеліальної дисфункції. Пригнічення активності ендотеліальної NO синтази в умовах нашого експерименту свідчить про порушення фізіологічного синтезу оксиду азоту.*

Ключові слова: цукровий діабет, експеримент, діабетична ретинопатія, дисфункція ендотелію, фактор Віллебранда, ендотеліну-1, ендотеліальна синтаза оксиду азоту.

### Вступ

Одним з основних ускладнень цукрового діабету, який може призвести до інвалідизації хворих, є діабетична ретинопатія (ДР) [1,2,3,4,5,6]. Під час розвитку цієї мікросудинної патології відбувається ураження судин сітківки із подальшим утворенням мікроаневризм, крово-вививів та можливим новоутворенням судин на очному дні. І як наслідок цих патофізіологічних зрушень знижується гострота зору та розвивається сліпота [7,8,9,10,11,12]. Про розповсюдженість діабетичної ретинопатії свідчить той фактор, що на її частку припадає 80 – 90 % від усієї інвалідності по зору при цукровому діабеті [13].

Діабетична ретинопатія була вперше описана майже 150 років тому МакKenzie (1879), проте

проблема корекції даної патології є актуальною і по сьогоднішній день [14]. Наприклад, у хворих ЦД 1-го типу у віці до 30 років із 10-річним стажем хвороби діабетична ретинопатія розвивалась у 89 % випадків, при цьому частка проліферативної ДР займала 30 %. При цукровому діабеті другого типу частка ДР складала біля 20 % у пацієнтів, які хворіють на ЦД менш ніж два роки [15]. Доведено, що порушення ендотелію та еластичних властивостей артерій невід'ємно пов'язано з виникненням та прогресуванням ускладнень діабету [16]. Також слід підкреслити роль гіпертензії в якості важливого чинника патогенезу діабетичної ретинопатії [17].

### Мета роботи

Дослідити маркери функціонального стану ендотелію (рівень фактора Віллебранда та ендотеліну-1 і активність ендотеліальної NO-синтази) при експериментальній діабетичній ретинопатії.

### Матеріали та методи дослідження

Експеримент проведено на щурах самцях лінії Вістар, масою 180-220 грам, віком до 3-х місяців включно. В ході експерименту тварини були розподілені на дві групи: 1-а група – 20 інтактних тварин; 2-а група – 60 тварин зі змодельованим цукровим діабетом та непроліферативною діабетичною ретинопатією. Виводились з експерименту на 30 добу шляхом декапітації під легким ефірним наркозом. Забір крові здійснювали із ретроорбітального венозного сплетіння, яке лежить в орбіті позаду очного яблука. Контролем потрапляння у венозне сплетіння було наповнення капіляра піпетки кров'ю (Дьяконов А.В., Хрикіна І.С., Хегай А.А. та ін., 2013). Рівень фактора Віллебранда визначали фотоелекторолориметричним методом за ристоцитиновим часом. Визначення вмісту ендотеліну-1 проводили імуноферментним методом. Активність ендотеліальної NO-синтази визначали спектрофотометричним методом. Дослідження проводили згідно з «Правилами виконання робіт з використанням експериментальних тварин», затверджені

них Наказом МОЗ України № 249 від 01.03.2012 та Законом України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (зі змінами від 15.12.2009 р. та від 16.10.2012 р.).

### Результати дослідження

Одержані нами результати підтверджують відомі з літературних джерел дані про те, що порушення функціонування ендотелію є ключовою складовою розвитку діабетичної ретинопатії [18]. Це в першу чергу пов'язано із чутливістю ендотеліоцитів до окислювального стресу, гіперглікемії та гіперліпідемії. Зазначений комплекс патологічних чинників призводить до ушкоджень клітин ендотелію, дизрегуляції балансу біологічно активних речовин, які відповідають за міжклітинну взаємодію, функціонування судин та стан гемостазу [19].

При дослідженні ендотеліальної синтази оксиду азоту на 30 добу (рис. 1) отримані наступні дані: виявлені дуже високо значущі відмінності ( $p < 0,001$ ) при порівнянні результатів групи №2, в якій тваринам моделювали діабетичну ретинопатію без корекції у порівнянні з даними інтактних тварин. Встановлене зменшення активності даного показника. Вищезазначене свідчить про порушення фізіологічного синтезу оксиду азоту, і відповідно – про розвиток дисфункції ендотелію на тлі змодельованого патологічного стану.

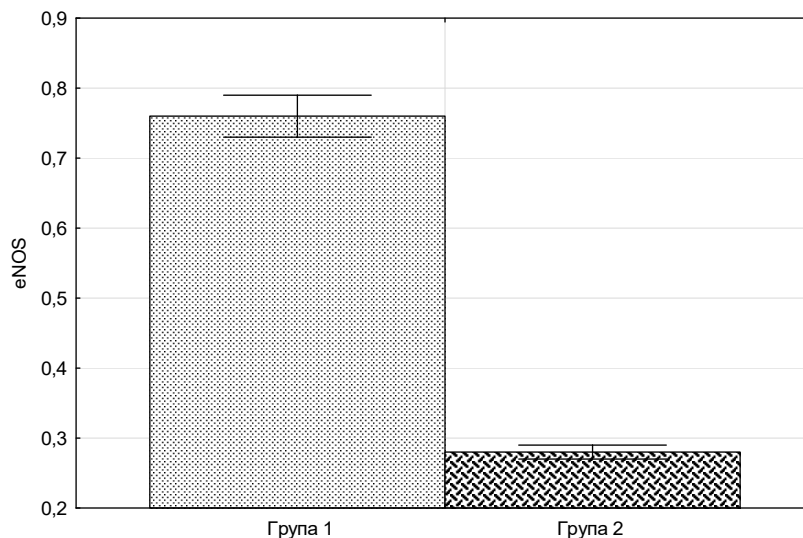


Рис. 1. Зміни активності eNOS (мікромоль/літр/годину) у крові лабораторних тварин зі змодельованою діабетичною ретинопатією.

Основний субстрат синтезу оксиду азоту - L-аргінін, який за допомогою ендотеліальної NO-синтази, забезпечує фізіологічну кількість NO для нормального функціонування судин. Під час нашого дослідження було встановлено зниження активності ендотеліальної NO-синтази у тварин із змодельованим ЦД. Наші результати підтверджують те, що порушення синтезу оксиду азоту є важливою патогенетичною ланкою в розвитку цукрового діабету і ключовою причиною ендотеліальної дисфункції [20].

Для більш детального вивчення функціонального стану ендотелію та його порушення нами був обраний фактор Віллебранда – один із загальноприйнятих маркерів пошкодження функціонального стану ендотелію.

Отримані нами дані (рис. 2) підтверджують розвиток ендотеліальної дисфункції при непроліферативній діабетичній ретинопатії. У групі зі змодельованою патологією встановлене підвищення рівня досліджуваного маркера у порівнянні з даними інтактних тварин ( $p < 0,001$ ).

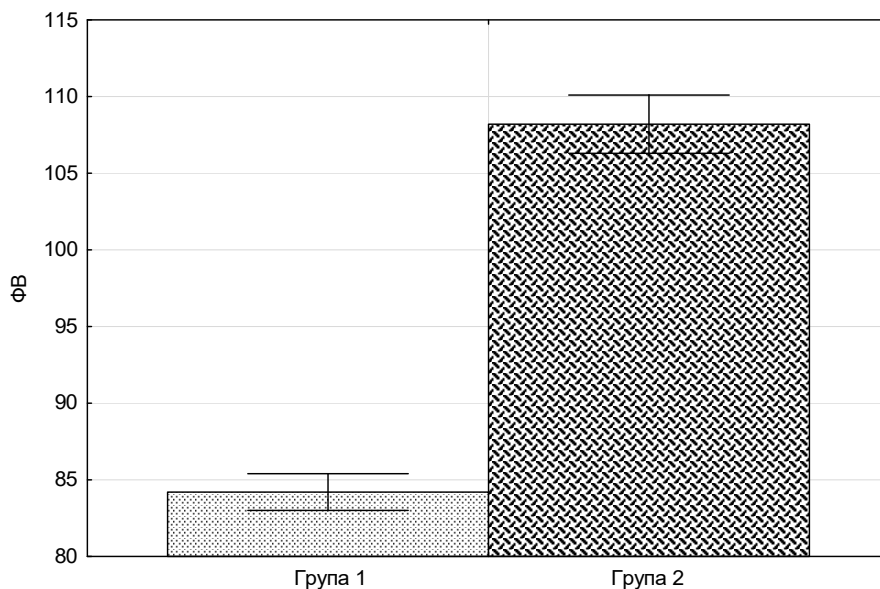


Рис. 2. Зміни рівня фактора Віллебранда (%) у крові лабораторних тварин зі змодельованою діабетичною ретинопатією.

Взаємозв'язок між збільшенням рівня ФВ у крові зі ступенем пошкодження судинного ендотелію доведений під час моделювання у щурів ендотоксемії і механічному ураженні ендотелію [21].

Наступним показником для дослідження нами був обраний ендотелін-1. Він, як і фактор Віллебранда, є маркером ендотеліальної дисфункції. Ендотелін-1 – класичний представник ендотелінів, із вираженими вазоконстрикторними влас-

тивостями [22]. Рівень ендотеліну-1 в крові є ключовим фактором вазоконстрикції [22]. Він може розглядатись як маркер серцево-судинних патологій, у першу чергу інфаркту міокарда та ішемічної хвороби серця [23] (рис. 3). Слід зазначити, що ендотелін-1 відіграє суттєву роль у патогенезі атеросклерозу, ішемічного пошкодження мозку, легеневої гіпертензії, розвитку цукрового діабету та його ускладнень і післяродових судинних пошкоджень [22, 23].

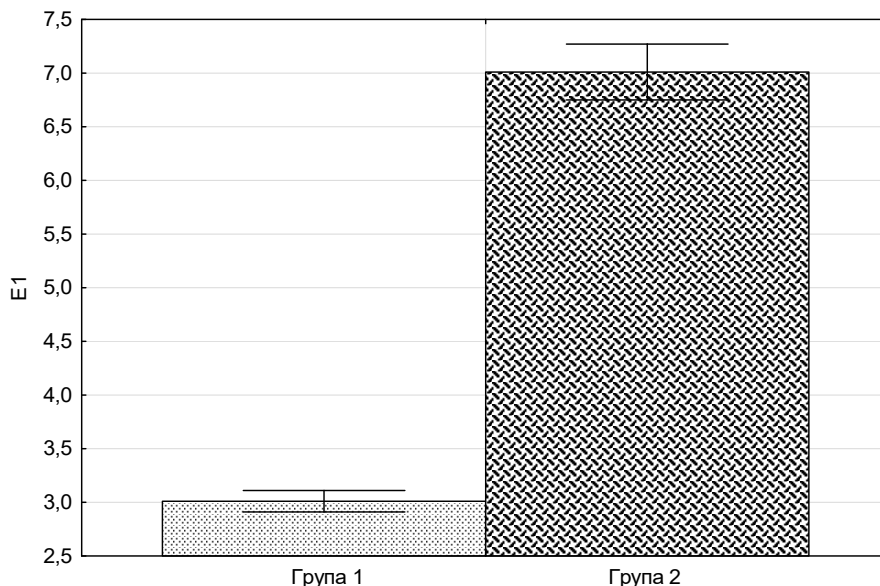


Рис. 3. Зміни рівня ендотеліну-1 (пкг/л) у крові лабораторних тварин зі змодельованою діабетичною ретинопатією.

У лабораторних щурів, в яких моделювали діабетичну ретинопатію, встановлено підвищення рівня ендотеліну-1 (статистичні відмінності виявлені на рівні значущості  $p < 0,001$ ). Отримані дані є ще одним підтверджуючим фактором порушення функціонування ендотелію на тлі роз-

витку ускладнення цукрового діабету, а також свідчать про підсилення вазоконстрикції, що призводить до ішемізації і подальшого пошкодження тканин.

## Висновки

1. Доведено, що розроблена нами експериментальна модель цукрового діабету та її ускладнення у вигляді діабетичної ретинопатії супроводжується розвитком ендотеліальної дисфункції.

2. Встановлено збільшення рівня фактора Віллебранда в умовах змодельованого патологічного процесу.

3. Також через 30 діб від початку експерименту виявлене підвищення ендотеліну-1 – маркера вазоконстрикції та ендотеліальної дисфункції.

4. Пригнічення активності ендотеліальної NO-синтази в умовах нашого експерименту свідчить про порушення фізіологічного синтезу оксиду азоту.

## Перспективи подальших досліджень

Перспективами досліджень є подальше розширення наших уявлень про патогенез діабетичної ретинопатії, зокрема перехід з непроліферативної у проліферативну фазу та визначення найбільш цінних у діагностичному плані маркерів патологічного процесу серед біохімічних показників. На основі одержаних результатів планується подальша розробка нових лікарських засобів, які сприятимуть призупиненню патологічного процесу, а також розробці консервативних методів лікування.

## Література

- Shadrichiev FE. Diabeticheskaja retinopatija (vzgljad oftal'mologa) [Diabetic retinopathy (ophthalmologist's view)]. *Oftal'mologija*. 2008; 3: 8–11. (Russian)
- American Diabetes Association. Microvascular Complications and Foot Care: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*. 2018;41(Suppl 1): S105-S118.
- Mironenko S. G. Zmist program fizichnoї reabilitacii dlja hvorih na cukrovij diabet [The content of physical rehabilitation programs for patients with diabetes]. *Visnik problem biologii i medicini*. 2019; 2(149): 10-14 (Ukrainian)
- Dedov II, Shestakova MV, Majorov AJu. Algoritmy specializirovannoї medicinskoї pomoshhi bol'nym saharnym diabetom [Algorithms for specialized medical care for patients with diabetes mellitus]. *Saharnyj diabet*. 2017; 20(18): 1-121. (Russian)
- World Health Organization. Diabetes. WHO Newsletter. November 2016 [Electronic resource]. (Russian). Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/ru/>
- Smirnov AV, Nakula MA. Saharnyj diabet 1-go tipa u detey i podrostkov: etiopatogenez, klinika, lecheniye [Type 1 diabetes mellitus in children and adolescents: etiopathogenesis, clinic, treatment]. *Lechashchij vrach*. 2015; 6: 31-6. (Russian).
- Semeraro F, Cancarini A, dell'Omo R, et al. Diabetic retinopathy: vascular and inflammatory disease. *Journal of Diabetes Research*. 2015; 3: 1–17.

- Netrebenko OK. Mladencheskiye istoki khronicheskikh neinfektsionnykh zabolevanij: sakharnyj diabet, ozhireniye, serdechno-sosudistyje zabolevaniya [Infant origins of chronic noncommunicable diseases: diabetes, obesity, cardiovascular disease]. *Pediatriya: zhurnal imeni G.N. Speranskogo*. 2014; 5(93): 109-17. (Russian).
- Andersen N, Hjortdal JO, Schielke KC, et al. The Danish Registry of Diabetic Retinopathy. *Clin Epidemiol*. 2016; 8: 613-9.
- Buryakovskaya AA, Isayeva AS. Sakharnyj diabet: rol' genicheskikh faktorov v razvitanii zabolevaniya [Diabetes mellitus: the role of genetic factors in the development of the disease]. *Mizhnarodnij endokrinologichnij zhurnal*. 2017; 1(13): 110-9. (Russian).
- Antoshchuk RYa. Tsukrovij diabet: etiologiya zakhvoryuvannya [Diabetes mellitus: etiology of the disease]. *Molodyy uchenyy*. 2016; 6: 277-80. (Ukrainian).
- Bezdetko PA, Gorbachova OV. Epidemiologija i chastota cukrovogo diabetu ta DR [Epidemiology and frequency of cerebral diabetes and DR]. *Mizhnarodnij endokrinologichnij zhurnal*. 2006;6:37-45. (Ukrainian)
- Pan'kiv VI. Cukrovij diabet: viznachennja, klasifikacija, epidemiologija, faktori riziku [Diabetes mellitus: definition, classification, epidemiology, risk factors]. *Mezhdunarodnyj jendokrinologicheskij zhurnal*. 2013;7 (55):95–104. (Ukrainian)
- Petrovski G, Kaarniranta K, Petrovic D. Oxidative stress, epigenetics, environment, and epidemiology of diabetic retinopathy. *Journal of Diabetes Research*. 2017;2:1–3. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/6419357>
- Nentwich MM, Ulbig MW. Diabetic retinopathy – ocular complications of diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2015;6(3):489–99.
- Widlansky ME, Gokce N, JF Jr. Keaney, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;42:1149–60.
- Sjoellie AK, Klein R, Porta M et al. Direct Programme Study Group. Effect of Candesartan on progression and regression retinopathy in type 2 diabetes (DIRECT-Protect2); a randomised placebocontrolled trial. *Lancet*. 2008;372:1385–93.
- Shelkovnikova TV, Tahchidi HP, Kacadze JuL, Shishljannikova NJu. Nekotoryje parametry gemostaza i jendotelial'noj disfunkcii u pacientov s diabeticheskim makuljarnym otekom na fone saharного diabetа 2 tipа [Some parameters of hemostasis and endothelial dysfunction in patients with diabetic macular edema with type 2 diabetes mellitus]. 2015. Available from: [http://www.rusnauka.com/34\\_WP\\_2015/Medecine/7\\_181692.doc.htm](http://www.rusnauka.com/34_WP_2015/Medecine/7_181692.doc.htm) (Russian)
- Quyuyumi AA. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am J Med*. 1998;105:325-95.
- Lapshina LA, Kravchun PG, Titova A.Ju, Glebova OV. Znachenie opredelenija nitritov-nitratov kak markerov disfunkcii jendotelija pri serdechno-sosudistoj patologii [The value of determining nitrite nitrates as markers of endothelial dysfunction in cardiovascular disease]. *Ukrains'kij medicnij chasopis*. 2009;6(74); X1-XII:49-53. (Russian)
- Malaja LT, Korzh AN, Balkovaja LB. Zndotelial'naja disfunkcija pri patologii serdechno-sosudistoj sistemi [Endothelial dysfunction in the pathology of the cardiovascular system]. H: Torsing, 2000. 432 p. (Russian)
- Dremina NN, Shurygin MG, Shurygina IA. Jendoteliny v norme i patologii [The endothelium is normal and pathological]. *Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovanij*. 2016;10(2):210-214 (Russian)
- Rivera M. Plasma concentration of big endothelin-1 and its relation with plasma nT-proBnP and ventricular function in heart failure patients. *Rev. Esp. Cardiology*. 2005;158:241-3.
- Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *The new England journal of medicine*. 2004;351:1425-36.

## Реферат

ПАТОГЕНЕЗ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

Сирман Я.В., Савицкий И.В.

Ключевые слова: сахарный диабет, эксперимент, диабетическая ретинопатия, дисфункция эндотелия, фактор Виллебранда, эндотелин-1, эндотелиальная синтаза оксида азота.

Одним из основных осложнений сахарного диабета, который может привести к инвалидизации больных, является диабетическая ретинопатия. Цель: исследование маркеров дисфункции эндотелия при экспериментальной диабетической ретинопатии. Материалы и методы исследования: Эксперимент проведен на крысах самцах линии Вистар, массой 180-220 грамм в возрасте до 3-х месяцев включительно. В ходе эксперимента животные были разделены на две группы. Первая группа - 20 интактных животных; Вторая группа - 60 животных со смоделированным сахарным диабетом и непролиферативной диабетической ретинопатией. Результаты исследования. При исследовании эндотелиальной синтазы оксида азота получены следующие данные: обнаружены очень высоко значимые ра-

зличия ( $p < 0,001$ ) при сравнении результатов группы №2, в которой животным моделировали диабетической ретинопатией без коррекции по сравнению с данными интактных животных. Установлено уменьшение активности данного показателя. Для более детального изучения функционального состояния эндотелия и его нарушения нами был выбран фактор Виллебранда - один из общепринятых маркеров повреждения функционального состояния эндотелия. В группе со смоделированной патологией установлено повышение уровня исследуемого маркера по сравнению с данными интактных животных ( $p < 0,001$ ). У лабораторных крыс, у которых моделировали диабетическую ретинопатию, установлено повышение уровня эндотелина-1 (статистические различия обнаружены на уровне значимости  $p < 0,001$ ). Выводы. Доказано, что разработанная нами экспериментальная модель сахарного диабета и его осложнений в виде диабетической ретинопатии сопровождается развитием эндотелиальной дисфункции. Установлено увеличение уровня фактора Виллебранда в условиях смоделированного патологического процесса. Также через 30 суток от начала эксперимента выявлено повышение эндотелина-1 - маркера вазоконстрикции и эндотелиальной дисфункции. Подавление активности эндотелиальной NO-синтазы в условиях нашего эксперимента свидетельствует о нарушении физиологического синтеза оксида азота.

### **Summary**

#### **PATHOGENESIS OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN DIABETIC RETINOPATHY DURING STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES MELLITUS**

Sirman Ya. V., Savytskyi I. V.

Key words: diabetes mellitus, experiment, diabetic retinopathy, endothelial dysfunction, Von Willebrand factor, endothelin-1, endothelial NO synthase.

One of the main diabetes complications that can lead to the disability of patients is diabetic retinopathy. The purpose of the study was to investigate endothelial dysfunction markers in modelled diabetic retinopathy. Material and methods. The experiment was conducted on male rats of the Wistar line, weighing 180-220 grams, up to 3 months of age (inclusive). During the experiment, the animals were divided into two groups. The 1<sup>st</sup> group included 20 intact animals; the 2<sup>nd</sup> group had 60 animals with modelled diabetes mellitus and non-proliferative diabetic retinopathy. Results and discussion. Having studied endothelial nitric oxide synthase, we have found out significant differences ( $p < 0.001$ ) when comparing the findings obtained in the 2<sup>nd</sup> group with the findings of the intact animals. The 2<sup>nd</sup> group rats were simulated with diabetic retinopathy without following correction. We also observed the decreasing dynamics of this index. For a more detailed study of the functional state of the endothelium and its disruption, we selected the von Willebrand factor, which is one of the common markers showing the damage to the functional state of the endothelium. In the group with simulated pathology, the level of the investigated marker increased compared with intact animals ( $p < 0.001$ ). There was an increase in endothelin-1 level ( $p < 0.001$ ) in the laboratory rats with modelled diabetic retinopathy. Conclusion. The study results have proven that our experimental model of diabetes mellitus and one of its complications, diabetic retinopathy is accompanied by the development of endothelial dysfunction. There has been found as increase in the von Willebrand factor in the modelled pathological process. We have detected an increase in endothelin-1, a marker of vasoconstriction and endothelial dysfunction, 30 days since the beginning of the experiment. Inhibition of endothelial NO synthase activity indicates an impairment of the physiological NO synthesis.