DOI 10.31718/2077-1096.21.3.208

УДК 616-06:616-092.9

Сірман Я.В., Савицький І.В., Прейс Н.І.

ЗМІНИ АКТИВНОСТІ ІНДУЦИБЕЛЬНОЇ СИНТАЗИ ОКСИДУ АЗОТУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ДІАБЕТИЧНІЙ РЕТИНОПАТІЇ ТА СПОСОБАХ ЇЇ КОРЕКЦІЇ

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

Діабетична ретинопатія за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я – основна причина зниження зору та сліпоти при цукровому діабеті. Мета дослідження: аналіз змін активності індуцибельної синтази оксиду азоту при експериментальній діабетичній ретинопатії та при різних способах її корекції. Матеріал та методи. Дослідження проводилося на білих щурах лінії Вістар масою 180-200 г. Відповідно до задач тварини були розподілені на 7 груп: 1-а група – 60 інтактних тварин; 2-а група – 60 тварин, у яких моделювали діабетичну ретинопатію без подальшої корекції. 3 група – 60 тварин, у яких моделювали діабетичну ретинопатію з подальшою корекцією гіперглікемії. 4 група – 60 тварин, у яких моделювали діабетичну ретинопатію з подальшою корекцією гіперглікемії, введенням афліберцепта та розчину L-аргініну. 5 група – 60 тварин, у яких моделювали діабетичну ретинопатію з подальшою корекцією гіперглікемії, введенням афліберцепта та бромфенаку. 6 група – 60 тварин, у яких моделювали діабетичну ретинопатію з подальшою корекцією гіперглікемії, введенням афліберцепта, L-карнітину та бромфенаку. 7 група – 60 тварин, у яких моделювали діабетичну ретинопатію з подальшою корекцією гіперглікемії, введенням афліберцепта, розчину L-аргініну та цитиколіну. Результати та висновки. Одержані результати свідчать про підвищення активності індуцибельної синтази оксиду азоту, починаючи із 30-ї та з подальшим прогресуванням на 60-у та 180-у доби експериментальної діабетичної ретинопатії, що свідчить про порушення фізіологічного шляху синтезу оксиду азоту. Корекція гіпоглікемічними засобами у 3-й групі мала позитивний ефект, але не була спроможна знизити активність індуцибельної синтази оксиду азоту, яка на 2-му та 3-му етапі підвищилася, тому виникла необхідність у застосуванні додаткових засобів. Застосування афліберцепту та донатора оксиду азоту у 4-й групі для корекції розвитку діабетичної ретинопатії суттєво знижувала активність індуцибельної синтази оксиду азоту (найбільш результативно на 180-у добу експерименту), проте не досягала контрольних показників. Доведено, що корекція, проведена у 5-й та 6-й групах значно знижувала активність індуцибельної синтази оксиду азоту але не досягала контрольних показників. У п'ятій групі на 180-у добу активність маркера навпаки підвищується. Максимально ефективною корекцією виявилось поєднання метформіну, афліберцепту, L-аргініну та цитиколіну щурам 7-ї групи, про що свідчить нормалізація рівню малонового діальдегіду на 60-у добу експерименту, а на 180-у було зафіксовано зниження вмісту маркера до контрольних показників.

Ключові слова: цукровий діабет, експериментальна діабетична ретинопатія, дисфункція ендотелію, індуцибельна синтаза оксиду азоту, синтез оксиду азоту, запалення.

Вступ

Діабетична ретинопатія (ДР) за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я – основна причина зниження зору та сліпоти при цукровому діабеті. Дана патологія є основною причиною інвалідизації по зору у населення економічно розвинених країн [1,2,3,4] і діагностується у 40-85 % пацієнтів, які страждають на цукровий діабет. Варто зауважити, що навіть при компенсації вуглеводного обміну продовжується розвиток ДР. Важливим фактором розвитку ретинопатії при цукровому діабеті є не лише гіперглікемія, а і артеріальна гіпертензія [5]. На сьогоднішній день доведена ключова роль дисфункції ендотелію у виникненні та прогресуванні ДР [6].

Оксид азоту, який є універсальним фізіологічним регулятором процесів клітинного метаболізму та міжклітинного взаємодіє в біологічних системах являє собою хімічну сполуку вільно радикальної структури. Багатьма дослідженнями доведено участь NO в регуляції багатьох функцій організму та органу зору зокрема. І хоча фізіологічна та патофізіологічна

роль оксиду азоту в оці ще не достатньо досліджена, проте доведено участь NO у патогенезі цілої низки очних захворювань [7].

Мета дослідження

Аналіз змін активності індуцибельної синтази оксиду азоту при експериментальній діабетичній ретинопатії та при різних способах її корекції.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводилося на білих щурах лінії Вістар масою 180-200 г. Відповідно до задач тварини були розподілені на 7 груп:

1-а група – 60 інтактних тварин;

2-а група – 60 тварин, у яких моделювали діабетичну ретинопатію без подальшої корекції;

3 група – 60 тварин, у яких моделювали діабетичну ретинопатію з подальшою корекцією гіперглікемії;

4 група – 60 тварин, у яких моделювали діабетичну ретинопатію з подальшою корекцією гіперглікемії, введенням афліберцепта та розчину L-аргініну;

5 група – 60 тварин, у яких моделювали діабетичну ретинопатію з подальшою корекцією гіперглікемії, введенням афліберцепта та бромфенаку;

6 група – 60 тварин, у яких моделювали діабетичну ретинопатію з подальшою корекцією гіперглікемії, введенням афліберцепта, L-карнітину та бромфенаку;

7 група – 60 тварин, у яких моделювали діабетичну ретинопатію з подальшою корекцією гіперглікемії, введенням афліберцепта, розчину L-аргініну та цитиколіну.

Цукровий діабет 2-го типу та діабетичну ретинопатію моделювали за допомогою інтраперитонального введення стрептозотоцину (Sigma, США) розчиненого в 0.1 М цитратному буфері з рН 4,5 [8]. Дозу стрептозотоцину 55 мг/кг маси тварини розділили на два введення. Введенню стрептозотоцину передувала високожирова дієта протягом 28-и діб [9].

Дози препаратів:

Гіпоглікемічний препарат - метформін (Merck Sante, виробництво Франція) - у дозі 300 мг/кг маси у питтєвій формі [10] на 0,9% розчині натрія хлориду через шприц з внутрішньошлунковим зондом щоденно.

Введення розчину L-аргініну, який є донатором NO, (CIMECTA, виробництво Китай, стандарт якості USP32) здійснювалось шляхом внутрішньошлункового введення розчину L-аргініну на 0,9% розчині натрія хлориду в дозі 500 мг/кг [11] через шприц з внутрішньошлунковим зондом. Об'єм розчину залежав від маси тварини і не перевищував 1 мл. Препарат вводили 1 раз на добу до вранішнього годування, щоденно протягом 10 днів [11].

Афліберцепт (anti-VEGF терапію) вводили у формі субкон'юнктивальних ін'єкцій у дозі 0,08 мл (25 мг/мл) [12].

Бромфенак – інстиляції 0,09 % розчину очних крапель 1 раз на добу [13].

L-карнітин ("Sigma", США) вводили у формі водного розчину через шприц з внутрішньошлунковим зондом у дозі 25 мг/100 г маси тварини [14, 15].

Цитиколін - 81,8 мг/кг (0,33 мл/кг) вводили внутрішньом'язово 1 раз на добу.

Виведення тварин із експерименту проводилося у три етапи:

1-й етап дослідження – 30-а доба після початку моделювання цукрового діабету;

2-й етап дослідження – 60-а доба після початку моделювання цукрового діабету;

3-й етап дослідження – 180-а доба після початку моделювання цукрового діабету.

Тварин виводили з досліду шляхом декапітації під легким ефірним наркозом згідно з «Правилами виконання робіт з використанням експериментальних тварин», затверджених Наказом МОЗ України № 249 від 01.03.2012 та Законом України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (зі змінами від

15.12.2009р та від 16.10.2012р).

Здійснювали забір крові з ретроорбітально-го венозного сплетіння, яке лежить в орбіті позаду очного яблука. Прокол здійснювали круговими рухами скляною піпеткою з відтягнутим капіляром, вістря якого сточене під кутом 45 °. Проколювали кон'юнктивальний мішок у медіальному куті ока між очним яблуком та орбітою. Після проколу піпетку вводили на глибину до 2-4 мм за очне яблуко. Контроль потрапляння у венозне сплетіння – наповнення капіляра піпетки кров'ю (Дьяконов А.В., Хрикіна І.С., Хегай А.А. та ін., 2013).

Активність індукцибельної синтази оксиду азоту визначали спектрофотометричним методом по приросту концентрації нітритів та нітратів у реакційній суміші [16].

Статистична обробка отриманих результатів

Для виявлення зміни у досліджуваних показниках між різними групами та на різних етапах були використані параметричні статистичні методи, в основу яких покладено оперування з параметрами статистичного розподілу (середнім та дисперсією). Використані методи розраховані на нормально розподілені дані, тому ми виконали перевірку всіх даних на нормальність за допомогою критерію асиметрії та експесу Є.І. Пустильника.

Всі дані, які ми розглядаємо, виявилися нормально розподіленими, тому можна попарно порівнювати середні значення вибірок. Зауважимо, що в подальших порівняннях ми виконуємо порівняння у незалежних вибірках. Це будуть порівняння між різними групами тварин або порівняння між тією ж групою тварин (але так як у вибірках не має відповідності між тваринами, то вони теж будуть незалежними). Значення $p < 0.05$ було обране у якості критерію достовірності. Був проведений аналіз, чи відрізняються середні значення. Результати визначення t-критерію дають відповідь про рівність або відмінність середніх значень, але вони не дають можливості точно вимірювати різницю між середніми значеннями. Зауважимо, що ця різниця є досить умовною. Ця різниця була розрахована у відсотках. Таким чином, ми продемонстрували порівняння середніх значень між різними групами тварин.

Результати дослідження та їх обговорення

Індукцибельна синтаза оксиду азоту активується цитокінами через сигнальний каскад. Рівень NO, який продукується iNOS, може в 1000 разів перевищувати рівні оксиду азоту, які продукуються ендотеліальною NOS [17]. Оксид азоту може, мінаючи ферментативні та не ферментативні системи, нап'ямую взаємодіяти із супероксидним аніон-радикалом. Під час таких реакцій утворюються молекули NO та аніони пероксинітритів, які після протонування розпадаються на активні NO₂ та OH-радикали, що

здатні приймати участь у ланцюгових вільно радикальних процесах та пошкоджувати практично всі біохімічні структури [18].

Результати дослідження змін активності ін-

дуцибельної синтази оксиду азоту у крові експериментальних тварин зі змодельованою діабетичною ретинопатією та при різних способах її корекції представлені у таблиці 1.

Таблиця 1.

Активність індуцибельної синтази оксиду азоту у крові експериментальних тварин зі змодельованою діабетичною ретинопатією та при різних способах її корекції на 30-у, 60-у та 180-у добу ($M \pm m$), (мікромоль/літр/годину)

Групи	Етапи	I етап	II етап	III етап
1 група		3,64±0,27	3,64±0,23	3,64±0,25
2 група		12,03±0,29	14,37±0,26	16,23±0,23
3 група		8,93±0,25	9,43±0,25	9,84±0,22
4 група		7,21±0,22	6,00±0,18	5,29±0,25
5 група		5,42±0,27	5,04±0,16	6,1±0,24
6 група		5,00±0,24	4,61±0,21	4,35±0,18
7 група		5,23±0,26	4,4±0,23	3,69±0,25

При дослідженні активності iNOS у 2-й групі виявлене її значне підвищення – на 69,75 % ($p < 0,001$). На другому етапі патологічне збільшення активності є ще більш вираженим порівняно з інтактними тваринами – на 74,66 % ($p < 0,001$), у порівнянні з попереднім етапом збільшення виявлене на 16,27 % ($p < 0,001$). На третьому етапі встановлено прогресування підвищення активності iNOS – на 77,57 % ($p < 0,001$) порівняно з інтактною групою; на 25,86 % ($p < 0,001$) у порівнянні з даними 2-ї групи на 1-му етапі, і на 11,46 % ($p < 0,001$) на 2-му.

При аналізі даних групи № 3 виявлене підвищення активності досліджуваного ферменту на першому етапі на 59,25 % ($p < 0,001$), але менш виражене, ніж у групі №2 – на 34,71 % ($p < 0,001$). На другому етапі встановлене збільшення на 61,36 % ($p < 0,001$) порівняно з групою №1, а у порівнянні з групою №2 патологічне збільшення iNOS є нижчим на 52,49 % ($p < 0,001$). На третьому етапі активність індуцибельної синтази оксиду азоту в 3-й групі більша на 63,01 % ($p < 0,001$) у порівнянні з даними щурів 1-ї групи, на 9,24 % ($p < 0,01$) вища за дані 3-ї групи на першому етапі, але є менш вираженою ніж у 2-й групі на третьому етапі – на 64,90 % ($p < 0,001$).

При дослідженні активності iNOS у крові щурів 4-ї групи виявлене підвищення на 49,49 % ($p < 0,001$) у порівнянні з інтактною групою. При цьому активність даного фермента є нижчою на 66,96 % ($p < 0,001$) порівняно з результатами групи № 2 (в якій не коригували патологічний процес) і на 23,95 % ($p < 0,001$) нижчою за результати 3-ї групи (в якій проводили лише корекцію гіперглікемії). На другому етапі під впливом коригуючої терапії активність досліджуваного показника дещо знизилась у порівнянні з попереднім етапом – на 20,09 % ($p < 0,001$). Активність показника є вищою на 39,32 % ($p < 0,001$) ніж у інтактних тварин. Порівняно з даними 2-ї групи – менш виражена на 139,48 % ($p < 0,001$), а відносно 3-ї – на 57,05 % ($p < 0,001$). На третьому етапі в 4-й групі порівняно з 1-ю активність iNOS є збільшеною на

31,15 % ($p < 0,001$), порівняно з 2-ю – активність менша на 206,90 % ($p < 0,001$), а порівнюючи з групою №3 – нижча на 86,11 % ($p < 0,001$) (що свідчить про позитивний вплив залучення донатора оксиду азоту до складу коригуючої терапії). У порівнянні з першим етапом активність iNOS на третьому етапі є менш підвищеною на 36,37 % ($p < 0,001$), а у порівнянні з другим – на 13,47 % ($p < 0,05$).

При аналізі активності індуцибельної синтази NO у 5-й групі встановлено, що на першому етапі вона вища на 32,84 % ($p < 0,001$) порівняно з даними інтактних тварин. Відносно групи без корекції (№2) активність нижча на 122,01 % ($p < 0,001$), відносно 3-ї групи – менш виражена на 64,81 % ($p < 0,001$), а у порівнянні з групою №4 – нижча на 32,97 % ($p < 0,001$). На другому етапі – активність досліджуваного ферменту є вищою на 27,72 % ($p < 0,001$) порівняно з даними 1-ї групи, у порівнянні з групою №2 – активність фермента нижча на 185,25 % ($p < 0,001$), порівняно з групою №3 – менша на 87,07 % ($p < 0,001$), а порівняно з 4-ю – нижча на 19,11 % ($p < 0,001$). На третьому етапі активність досліджуваного показника підвищилась на 11,15 % ($p < 0,05$) порівняно з 1-м етапом і на 17,41 % ($p < 0,001$) - порівняно з 2-им. Відносно інтактних тварин активність iNOS є вищою на 40,31 % ($p < 0,001$). Порівняно з групою №2, в якій моделювали діабетичну ретинопатію без корекції, активність фермента є менш вираженою на 166,08 % ($p < 0,001$), і на 61,36 % ($p < 0,001$) нижчою порівняно з групою №3, в якій змодельовану ДР коригували лише гіпоглікемічним препаратом. У порівнянні з групою №4, у якій до корекції долучали донатор оксиду азоту – у п'ятій групі ефективність (нормалізація активності iNOS) є менш вираженою на 13,30 % ($p < 0,05$). Отримані дані свідчать про наявність більш вираженої результативності порівняно з двома попередніми способами корекції (група №3 та №4), але ефект не є довготривалим – на третьому етапі спостерігається збільшення патологічної підвищеності активності iNOS.

При аналізі активності iNOS у крові експериментальних тварин 6-ї групи, в якій моделю-

вали ДР з подальшою корекцією гіперглікемії, введенням афліберцепта, L-карнітину та бромфенаку, на першому етапі виявлене її підвищення на 27,72 % ($p < 0,001$) у порівнянні з інтактними щурами, а порівняно з результатами групи №2 – вона нижча на 140,58 % ($p < 0,001$). Даний спосіб корекції на 78,60 % ($p < 0,001$) більш виражено сприяє зниженню патологічно підвищеної активності індукцйбельної синтази порівняно з 3-ю групою, і на 44,09 % ($p < 0,001$) – у порівнянні з 4-ю. Статистично значущих відмінностей у порівнянні з 5-ю групою не виявлено. На другому етапі порівняно з 1-ю групою активність фермента є вищою на 21,02 % ($p < 0,01$), а порівняно з 2-ю групою – нижча на 211,67 % ($p < 0,001$). Порівняно з 3-ю групою активність є менш вираженою на 104,39 % ($p < 0,001$), у порівнянні з 4-ю – на 30,14 % ($p < 0,001$), що безумовно свідчить про результативність корекції у 6-й групі. У порівнянні з 5-ю групою статистично значущих відмінностей не встановлено. На третьому етапі в шостій групі виявлене патологічне підвищення активності досліджуваного фермента лише на 16,35 % ($p < 0,05$). Порівняно з групою без корекції активність є нижчою на 272,89 % ($p < 0,001$). При порівнянні ефективності коригуючих засобів 6-ї групи у порівнянні з попередніми засобами корекції встановлено наступне: порівняно з 3-ю групою активність iNOS є менш вираженою на 126,13 % ($p < 0,001$), у порівнянні з 4-ю – на 21,50 % ($p < 0,01$) і у порівнянні з 5-ю на 40,14 % ($p < 0,001$). Вищезазначене свідчить про позитивний вплив розглянутого способом корекції на нормалізацію активності маркера гіперпродукції оксиду азоту та розвитку запального процесу. Також встановлено, що у порівнянні з даними цієї ж групи першого етапу активність є нижчою на 14,91 % ($p < 0,05$).

У сьомій групі, в якій при моделюванні ДР проводилась корекція гіперглікемії, введення афліберцепта, розчину L-аргініну та цитиколіну, активність iNOS на першому етапі була вищою за дані інтактних щурів на 30,39 %

($p < 0,001$). Порівняно з даними групи №2, активність фермента є нижчим на 130,1 % ($p < 0,001$), у порівнянні з групою №3 – на 70,81 % ($p < 0,001$), у порівнянні з 4-ю – на 37,81 % ($p < 0,001$). Статистичних відмінностей на цьому етапі при порівнянні з 5-ю та 6-ю групами не виявлено. На другому етапі встановлено що досліджуваний показник є на 17,21 % ($p < 0,05$) більшим за дані інтактної групи, патологічне підвищення є на 18,89 % ($p < 0,05$) нижчим порівняно з першим етапом. У порівнянні з 2-ю групою активність нижча на 226,72 % ($p < 0,001$), порівняно з 3-ю – на 114,26 % ($p < 0,001$), порівняно з 4-ю – на 36,43 % ($p < 0,001$), а з 5-ю – 14,54 % ($p < 0,05$). Відносно 6-ї групи статистично значущих відмінностей не виявлено. Звертають на себе увагу дані 3-го етапу експерименту – встановлено максимально виражену нормалізацію активності індукцйбельної синтази оксиду азоту – відмінностей між 7-ю та інтактною групами не встановлено. Порівняно з 2-ю групою активність є нижчою на 339,36 % ($p < 0,001$). У порівнянні з 3-ю групою встановлено нормалізацію активності фермента на 166,44 % ($p < 0,001$), порівняно з 4-ю – на 43,16 % ($p < 0,001$), у порівнянні з 5-ю групою – на 65,12 % ($p < 0,001$), і відносно 6-ї групи – на 17,82 % ($p < 0,05$). Вищезазначене є підтвердженням позитивного впливу використаного способу корекції. В даній групі на першому етапі результат є дещо нижчим, ніж у 6-й групі, але в подальшому ефективність є більш значно вираженою та стійкою.

Під час пригнічення активності ендотеліальної NO-синтази індукується система синтезу оксиду азоту через індукцйбельну NO-синтазу, а також залучається активація ангиогенезу. Під час цього процесу відбувається зниження приросту індекса резистентності ендотеліальної відповіді на регургітацію, яке неадекватне рівню оксиду азоту та пов'язане із експресією ендотеліну-1. Збільшення концентрації ендотеліну робить ендотелій менш чутливим до вазодилататорного ефекту оксиду азоту [19].

Рисунок 1. Активність індукцйбельної синтази оксиду азоту у крові експериментальних тварин зі змодельованою діабетичною ретинопатією та при різних способах її корекції на 30-у, 60-у та 180-у добу. Бокс плоти ілюструють розподіл величин рівню досліджуваного показника в усіх групах експерименту на кожному із етапів дослідження ($n=20$)

Вазоспазм, ішемія, запалення, ендотеліальна дисфункція призводять до так званого «роз'єднання» субодиниць eNOS, і такий фермент, поряд з NO, може виробляти супероксидний радикал, пероксинітрит, нітрозотіоли або інші сполуки з подальшим зменшенням біодоступності NO, що призводить до зниження базального рівня NO [20]. Зазначають, що пригнічення eNOS веде до компенсаторної активації патологічної форми -

індуцибельної iNOS (під впливом різних фізіологічних і патологічних факторів: прозапальні цитокіни, ендотоксини), в результаті чого підвищується рівень NO [20].

Наочно динаміку активності индуцибельної синтази оксиду у проведеному дослідженні проілюстровано на рис. 1.

Висновки

1. Одержані результати свідчать про підвищення активності индуцибельної синтази оксиду азоту, починаючи із 30-ї та з подальшим прогресуванням на 60-у та 180-у доби експериментальної діабетичної ретинопатії, що свідчить про порушення фізіологічного шляху синтезу оксиду азоту.

2. Корекція гіпоглікемічними засобами у 3-й групі мала позитивний ефект, але не була спроможна знизити активність индуцибельної синтази оксиду азоту, яка на 2-му та 3-му етапі підвищилася, тому виникла необхідність у застосуванні додаткових засобів.

3. Застосування афліберцепту та донатора оксиду азоту у 4-й групі для корекції розвитку діабетичної ретинопатії суттєво знижувала активність iNOS (найбільш результативно на 180-у добу експерименту), проте не досягала контрольних показників.

4. Доведено, що корекція, проведена у 5-й та 6-й групах, значно знижувала активність индуцибельної синтази оксиду азоту але не досягала контрольних показників. У п'ятій групі на 180-у добу активність маркера навпаки підвищується.

5. Максимально ефективною корекцією виявилось поєднання метформіну, афліберцепту, L-аргініну та цитиколіну щуром 7-ї групи, про що свідчить нормалізація рівню малонового діальдегіду на 60-у добу експерименту, а на 180-у було зафіксовано зниження вмісту маркера до контрольних показників.

Перспективи подальших досліджень

Одержані дані дозволяють розробити практичні рекомендації для застосування нових способів корекції при непроліферативній стадії діабетичної ретинопатії опираючись на аналіз шляху синтезу оксиду азоту. Враховуючи інформативність визначення активності индуцибельної синтази оксиду азоту, доцільним є подальше вивчення даного ферменту при дослідженні способів впливу на досліджуваний патологічний стан.

References

1. Sorokina yua, Lovtsova LV. Koeffitsienty oksiditel'nogo stressa kak sposob personifitsirovaniya farmakoterapii v debyute SD 2 tipa [Oxidative stress coefficients as a way to personalize pharmacotherapy in the onset of type 2 diabetes mellitus]. [Internet]. Meditsina i farmakologiya: elektron nauchn zhurn. 2014; 1 (14). Available from: <https://7universum.com/ru/med/archive/item/1868> (Russian)
2. Pasechnikova NV, Moroz OA. Issledovanie vliyaniya kvertsetina i lipoata na protsessy perekisnoho oksileniya lipidov v setchatke pri eksperimentalnom diabete [Study of the effect of quercetin and lipoate on the processes of peroxide lipid oxidation in the retina in experimental diabetes mellitus]. Oftalmologicheskii zhurnal. 2016; 4 (470):38-42 (Russian)
3. Vorob'eva IV, Repkina MYU. Prakticheskie rekomendatsii o nablyudenii bol'nyh s diabeticheskoy retinopatiej [Practical guidelines for monitoring patients with diabetic retinopathy]. Russkij medicinskij zhurnal. Endokrinologiya. 2009;17(24):1591-1595 (Russian)
4. Vorob'eva IV, Gigineishvili DN. Rol' disfunkcii endoteliya v patogeneze diabeticheskoy retinopatii u bol'nyh saharnym diabetom 2 tipa. Obzor [The role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. Overview]. Oftal'mologiya. 2012;9(3):9-13. (Russian)
5. Porta M, Maldari P, Mazzaglia F. New approaches to the treatment of diabetic retinopathy. Diabetes Obes Metab. 2011;13:784-790.
6. Gavrilova NA, Tishchenko OE. Vliyanie sulodeksida na funktsional'noe sostoyanie endoteliya u bol'nyh saharnym diabetom i diabeticheskoy retinopatiej [The effect of sulodexide on the functional state of the endothelium in patients with diabetes mellitus and diabetic retinopathy]. Saharnyj diabet. 2011;2:66-68 (Russian).
7. Uryas'ev OM, Shahanov AV. Rol' polimorfizma sintaz oksida azota v formirovanii komorbidnoj patologii - bronhial'noj astmy i gipertonicheskoy bolezni [The role of nitric oxide synthase polymorphism in the formation of comorbid pathology - bronchial asthma and hypertension]. Kazanskij medicinskij zhurnal. 2017;98(2): 226-232 (Russian).
8. Pasechnikova NV, Moroz OA. Zashchitnoe deystvie kvertsetina i lipoata na funktsionalnye hruppy belkov setchatki pri modelirovanii diabeta [Protective effect of quercetin and lipoate on functional groups of retinal proteins in diabetes mellitus modeling]. Oftalmologicheskii zhurnal. 2015; 3:76-81. (Russian).
9. Kaydash OA, Ivanov VV, Venherovskiy AI, Buyko EE, Shchepetkin IA. Eksperimental'naya model sakharnogo diabeta 2-ho tipa u krysa, vyzvannaya dietoy s vysokim soderzhaniiem zhirov i streptozototsinom v nizkoy doze [Experimental model of type 2 diabetes mellitus in rats induced by a diet high in fat and low dose streptozotocin]. Byulleten sibirskoy meditsiny. 2020; 19(2):41-47. (Russian).
10. Bayrasheva VK, Babenko ayu, Dmitriev yuv, et al. Rol' metformina v profilaktike diabeticheskoy nefropatii pri eksperimentalnom sakharnom diabete 2 tipa [The role of metformin in the prevention of diabetic nephropathy in experimental type of 2 diabetes mellitus]. Rehiionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya. 2016; 15(3):70-80. (Russian).
11. Pokrovskiy MV, Pokrovskaya TH, Korchakov VI. Endotelioprotektornye efekty L-arginina pri modelirovanii defitsita oksidi azota [Endothelial protective effects of L-arginine in modeling nitric oxide deficiency]. Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya. 2008; 71 (2):29-31. (Russian)
12. Gal-Or O, Livny E, Sella R, et al. Efficacy of Subconjunctival Afibercept Versus Bevacizumab for Prevention of Corneal Neovascularization in a Rat Model. Cornea. 2016; 3(7):991-996.
13. Pavlova ON, Hulenko ON, Karimova RH. Issledovanie dinamiki aktivnosti katalazy v syvorotke krovi krysa pri mekhanicheskom vozdeystvii na hematooftalmicheskiy bar'yer [Study of the dynamics of catalase activity in the blood serum of rats under mechanical action on the blood-ophthalmic barrier]. Mezhdunarodnyi nauchno-issledovatel'skiy zhurnal. 2020;5 (95,1):153-158. (Russian)
14. Bykov IL. Vliyanie L-karnitina na metabolicheskie narusheniya pri eksperimentalnoy nedostatocnosti atsil-koa dehidrogenaz [Effect of L-carnitine on metabolic disorders in experimental deficiency of acyl-coa dehydrogenases]. Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya. 2004; 6(67):48-52. (Russian)
15. Dzuhkoev SH, Dzukoieva FS, Humanova NV. Metelskaya VA. Vliyanie koenzima Q 10, afobazola i L-karnitina na endotelial'nuyu funktsiyu u krysa s eksperimentalnym sakharnym diabetom [Effect of coenzyme Q 10, afobazole and L-carnitine on endothelial function in rats with experimental diabetes mellitus]. Kubanskiy nauchnyi meditsinskiy vestnik. 2012; 3 (132):48-51. (Russian)
16. Koval'ova OM, Demidenko GV, Gorbach TV. Diagnostika endotelial'noj funktsii - ocenka vazoaktivnogo pula oksida azota [Diagnosis of endothelial function - assessment of the

- vasoactive pool of nitric oxide]. Ministerstvo ohoroni zdorov'ya Ukraini. Ukrains'kij centr naukoivoi medichnoi informacii ta patentno-licenzijnoi roboti. Metodichni rekomendacii. Kyiv: vidavnistvo SPD FO Tarasenko V.P.; 2007. 16 s. (Russian)
17. Deryagina V.P., Ryzhova N.I., Krivosheeva L.V., Golubeva I.S. Formation of nitric oxide metabolites during growth of transplanted tumors with different metastatic potential. *Biochemistry. Suppl. Series B: Biomed Chemistry*. 2015;9(2):130-136.
 18. Deryagina VP, Reutov VP. Modulirovanie obrazovaniya aktivnyh form azota ingredientami rastitel'nyh produktov pri ingibirovanii kancerogeneza [Modulation of the formation of active forms of nitrogen by ingredients of plant products during inhibition of carcinogenesis]. *Uspekhi molekulyarnoj onkologii*. 2019;6(1):18-36. (Russian).doi: 10.17650/2313-805X-2019-6-1-18-36
 19. Gulanom ZSH. Vliyanie L-arginina na disfunkciju endoteliya u bol'nyh s vrozhdynnym prolapsom mitral'nogo klapana [Effect of L-arginine on endothelial dysfunction in patients with congenital mitral valve prolapse]. *Kazanskij medicinskij zhurnal*. 2014;95(3):326-331 (Russian). Doi: 10.17816/KMJ1506
 20. Rozhdestvenskaya TA, Lazuko SS. Vliyanie inducibel'noj NO-sintazy i oksida azota v syvorotke krovi beremennyh s arterial'noj gipertenziej na sostoyanie plodovogo krovotoka [Influence of inducible NO-synthase and nitric oxide in blood serum of pregnant women with arterial hypertension on the state of fetal blood flow]. *Problemy reprodukcii*. 2015; 5:127-131 (Russian).

Реферат

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ СИНТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ И СПОСОБЫ ЕЕ КОРРЕКЦИИ

Сирман Я.В., Савицкий И.В., Преис Н.И.

Ключевые слова: сахарный диабет, экспериментальная диабетическая ретинопатия, дисфункция эндотелия, индуцибельная синтаза оксида азота, синтез оксида азота, воспаление.

Диабетическая ретинопатия по данным Всемирной организации здравоохранения - основная причина снижения зрения и слепоты при сахарном диабете.

Цель исследования: анализ изменений активности индуцибельной синтазы оксида азота при экспериментальной диабетической ретинопатии и при различных способах ее коррекции.

Материал и методы. Исследование проводилось на белых крысах линии Вистар массой 180-200 г. В соответствии с задачами животные были разделены на 7 групп: первая группа - 60 интактных животных; вторая группа - 60 животных, у которых моделировали диабетическую ретинопатию без дальнейшей коррекции. 3 группа - 60 животных, у которых моделировали диабетическую ретинопатию с последующей коррекцией гипергликемии. 4 группа - 60 животных, у которых моделировали диабетическую ретинопатию с последующей коррекцией гипергликемии, введением афлиберцепта и раствора L-аргинина. 5 группа - 60 животных, у которых моделировали диабетическую ретинопатию с последующей коррекцией гипергликемии, введением афлиберцепта и бромфенака. 6 группа - 60 животных, у которых моделировали диабетическую ретинопатию с последующей коррекцией гипергликемии, введением афлиберцепта, L-карнитина и бромфенака. 7 группа - 60 животных, у которых моделировали диабетическую ретинопатию с последующей коррекцией гипергликемии, введением афлиберцепта, раствора L-аргинина и цитиколина.

Результаты и выводы. Полученные результаты свидетельствуют о повышении активности индуцибельной синтазы оксида азота, начиная с 30-х и с последующим прогрессированием на шестидесятые и сто восьмидесятые сутки экспериментальной диабетической ретинопатии, что свидетельствует о нарушении физиологического пути синтеза оксида азота. Коррекция гипогликемическими средствами в 3-й группе имела положительный эффект, но не была способна снизить активность индуцибельной синтазы оксида азота, которая на 2-м и 3-м этапе повысилась, поэтому возникла необходимость в применении дополнительных средств. Применение афлиберцепта и донатора оксида азота в 4-й группе для коррекции развития диабетической ретинопатии существенно снижала активность индуцибельной синтазы оксида азота (наиболее результативно на сто восьмидесятые сутки эксперимента), однако не достигала контрольных показателей. Доказано, что коррекция, проведенная в 5-й и 6-й группах, значительно снижала активность индуцибельной синтазы оксида азота, но не достигала контрольных показателей. В пятой группе на сто восьмидесятые сутки активность маркера наоборот повышается. Максимально эффективной коррекцией оказалось сочетание метформина, афлиберцепта, L-аргинина и цитиколина крысам 7-й группы, о чем свидетельствует нормализация уровня малонового диальдегида на шестидесятые сутки эксперимента, а на сто восьмидесятые было зафиксировано снижение содержания маркера к контрольным показателям.

Summary

CHANGES IN ACTIVITY OF INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE IN EXPERIMENTAL DIABETIC RETINOPATHY AND METHODS FOR ITS CORRECTION

Sirman Y.V., Savytskyi I.V., Preys N.I.

Key words: diabetes mellitus, experimental diabetic retinopathy, endothelial dysfunction, inducible nitric oxide synthase, nitric oxide synthesis, inflammation.

Diabetic retinopathy according to the World Health Organization reports is known as the main cause of decreased vision and blindness in diabetes. The purpose of the study is to analysis of changes in the activity of inducible nitric oxide synthase in experimental diabetic retinopathy and in various methods of its correction. Materials and methods. The research was carried out on white Wistar rats weighting 180-220 g. The animals were divided into 7 groups: 1st group included 60 intact animals; 2nd group involved 60 animals with modelled diabetic retinopathy (DR) without further correction; 3rd group included 60 animals with modelled DR and subsequent hyperglycemia correction; 4th group included 60 animals with modelled DR, which received subsequent hyperglycemia correction with aflibercept and L-arginine solution administration; 5th

group consisted of 60 animals with modelled DR and subsequent hyperglycemia correction by aflibercept and bromfenac administration; 6th group was formed by 60 animals with modelled DR and subsequent hyperglycemia correction by aflibercept, L-carnitine and bromfenac administration; and the 7th group included 60 animals with modelled DR and subsequent hyperglycemia correction by aflibercept, L-arginine solution and citicoline. Results and conclusion. The results obtained demonstrate an increase in the activity of inducible nitric oxide synthase, starting from the 30th day of the experiment and with subsequent progression to the 60 and 108 days of experimental diabetic retinopathy that points out the deterioration of the physiological pathway of nitric oxide synthesis. Correction with hypoglycemic agents in group 3 had a positive effect, but was not able to reduce the activity of inducible nitric oxide synthase, which increased in the 2nd and 3rd stages, thus, there was a need for additional agents. The use of aflibercept and nitric oxide donor in group 4 to correct the progression of diabetic retinopathy significantly reduced the activity of inducible nitric oxide synthase (most effectively on the one hundred and eighty days of the experiment), but did not reach the control values. It has been proved that the correction applied in groups 5 and 6 significantly reduced the activity of inducible nitric oxide synthase but did not reach the control values. Moreover, the marker activity in the group 5 grew up on the 108 day. The study has shown the most effective correction includes a combination of metformin, aflibercept, L-arginine and citicoline given to the rats of group 7, as evidenced by the normalization of malonic dialdehyde levels on the 60 day of the experiment; on the 108 days of experiment there has been a decrease in marker content to control values.

DOI 10.31718/2077-1096.21.3.214

УДК 616.36:599.323.3-071

Френкель Ю.Д., Черно В.С., Костенко В.О.

ВПЛИВ ПІРОЛІДИНДІТІОКАРБАМАТУ АМОНІЮ НА УТВОРЕННЯ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ ТА АЗОТУ В ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЇХ ЦІЛОДОБОВОГО ОСВІТЛЕННЯ ТА УТРИМАННЯ НА ВУГЛЕВОДНО-ЛІПІДНІЙ ДІЄТІ

Чорноморський національний університет імені Петра Могили, м. Миколаїв,
Полтавський державний медичний університет

У експерименті на 21 білому щурі досліджено вплив інгібітора ядерного чинника капа В на продукцію активних форм кисню та азоту в печінці тварин за умов їх цілодобового освітлення та утримання на вуглеводно-ліпідній дієті. Показано, що введення амонію піролідіндітіокарбамату (у дозі 76 мг/кг 3 рази на тиждень, починаючи з 30 доби експерименту) на тлі призначення щурам вуглеводно-ліпідної дієти (60 діб) та цілодобового освітлення (1500 лк протягом останніх 30 діб експерименту) зменшувало у тканинах печінки вироблення супероксидного аніон-радикала НАДФН- і НАДН-залежними електронно-транспортними ланцюгами на 45.2 та 43.5%, відповідно. Вироблення цього радикала НАДФН-оксидазою лейкоцитів було на 41.6% нижчим за результат групи порівняння. Активність NO-синтази (загальна та її індукцйбельного ізоферменту) зменшувалася на 34.4 та 29.8%, активність конститутивної ізоформи зростала втричі. Індекс спряження останньої зростає у 5.16 рази, що вказує на відновлення спряженого стану цього ізоферменту. Зменшення генерації супероксидного аніон-радикала та оксиду азоту супроводжувалося зниженням на 36.4% концентрації пероксинітритів. Зроблено висновок, що введення інгібітора NF-капа В амонію піролідіндітіокарбамату при відтворенні моделі метаболічного синдрому шляхом цілодобового освітлення щурів та їх утримання на дієті, збагаченої вуглеводами та жирами, є ефективним засобом обмеження у тканинах печінки вироблення активних форм кисню та азоту.

Ключові слова: експериментальний метаболічний синдром, цілодобового освітлення, вуглеводно-ліпідної дієти, ядерний чинник капа В, піролідіндітіокарбамат амонію, активні форми кисню та азоту, печінка.

Робота є фрагментом НДР «Роль екологічно-небезпечних чинників у механізмах розвитку хвороб цивілізації» (№ державної реєстрації 0120U002026).

Раніше нами було показано, що за умов цілодобового освітлення щурів разом з призначенням вуглеводно-ліпідної дієти (ВЛД) спостерігалися більш глибокі метаболічні порушення, притаманні метаболічному синдрому (МС), а саме: рівень гіперінсулінемії, дисліпопротеїнемії, гіпо- α -ліпопротеїнемії, гіпертригліцеридемії, підвищення маси вісцерального жиру порівняно з окремим застосуванням наведеного раціону [1]. На підставі цього нами була запропонована експериментальна модель МС, що ґрунтується на відтворенні на тлі ВЛД гіпо-

пінеалізму [2]. За цих умов значно збільшувалося утворення активних форм кисню (АФК) в чутливих до інсуліну органах. При цьому продукція супероксидного аніон-радикала у тканинах печінки та м'язах стегна значно перевищувала швидкість утворення цього радикала при окремому застосуванні цілодобового освітлення та ВЛД [3].

Примітно, що порушення вуглеводного та ліпідного метаболізму при гіпомелатоніемії та забезпеченні тварин «дієтою західного типу» залежать від транскрипційного ядерного чин-