

DOI: 10.21802/artm.2022.1.21.39
УДК 616.24+616.092.9+616.379-008.64

СТАН ПРООКСИДАНТНОЇ ТА АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМ КРОВІ У БІЛИХ ЩУРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ

Л.М. Заяць, Ю.В. Федорченко

*Івано-Франківський національний медичний університет,
кафедра патофізіології, м. Івано-Франківськ, Україна,
ORCID ID: 0000-0003-3265-1273,
ORCID ID: 0000-0002-5042-1191,
e-mail: juliakozubash@gmail.com*

Резюме. Мета: вивчити стан прооксидантної та антиоксидантної систем крові у білих щурів при експериментальному цукровому діабеті.

Матеріали і методи. Модель цукрового діабету відтворювали шляхом внутрішньоочеревиного введення білим щурам стрептозотоцину фірми «Sigma» (США), розведеного в 0,1 М цитратному буфері з рН 4,5, з розрахунку 60 мг/кг маси тіла. Контрольній групі тварин внутрішньоочеревино вводили еквівалентну дозу 0,1 М цитратного буферного розчину з рН 4,5. У сироватці крові визначали вміст дієнових кон'югатів, активність каталази через 14, 28, 42 і 70 діб після ін'єкції стрептозотоцину.

Результати. Біохімічні дослідження сироватки крові показали, що у тварин з цукровим діабетом спостерігається підвищення рівня дієнових кон'югатів на всіх етапах експерименту: через 14 діб на 31,8%, через 28 діб на 104,4%, через 42 доби на 112,5% і через 70 діб на 125,4%. Водночас у сироватці зростала активність каталази. Зокрема через 14 діб концентрація цього ензиму була підвищена на 46,6 %. Через 28 діб експерименту визначалося подальше збільшення каталазної активності на 74,8%. Зі збільшенням терміну дослідження (42 доби) активність каталази зросла на 29,3%. Через 70 діб дослідження відзначалося зменшення каталазної активності на 28,1% порівняно з показником контрольної групи тварин.

Висновки. Експериментальний цукровий діабет протягом усього періоду дослідження супроводжується інтенсифікацією процесів ліпопероксидації, що проявляється достовірним підвищенням у сироватці крові вмісту дієнових кон'югатів. На тлі розвитку цукрового діабету у сироватці крові відзначається виснаження ферментної ланки антиоксидантної системи, про що свідчить зменшення каталазної активності, яка особливо виражена на 70-ту добу експерименту.

Ключові слова: стрептозотозин-індукований діабет, дієнові кон'югати, каталаза.

Вступ і обґрунтування дослідження. Сьогодні захворюваність на цукровий діабет (ЦД) є великою соціальною і медичною проблемою [1, 2, 3]. Відповідно до даних Міжнародної Діабетичної Федерації (IDF) кількість хворих на цукровий діабет у всьому світі зростає до 629 мільйонів до 2045 року [4].

Дослідженнями останніх років доведено, що ЦД супроводжується посиленням процесів вільнорадикального окиснення на тлі пригнічення функціональних можливостей антиоксидантного захисту [5]. Порушення процесів вільнорадикального окиснення ліпідів та ослаблення антиоксидантного захисту є однією з важливих ланок патогенезу багатьох захворювань, зокрема й ЦД [6, 7, 8]. Надмірна кількість вільних радикалів спричиняє розвиток ендотеліальної дисфункції, яка супроводжується мікрогемодинамічними порушеннями. Це зі свого боку призводить до дисбалансу в системі «вільнорадикальні реакції – антиоксидантна активність» і проявляється посиленням деструктивно-деструктивних процесів на клітинному рівні [9, 10]. Відомо, що первинними продуктами перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) є дієнові кон'югати (ДК) – результат окиснення поліненасичених вищих жирних кислот на стадії утворення та реалізації вільних радикалів, які мають ушкоджувальний вплив на ліпіди, білки, ферменти. Продукти ПОЛ є мембранотоксичні, вони деформують мембрани клітин, порушують їхню

осмотичну резистентність і електричний потенціал, денатурують білки, пошкоджують амінокислоти, сприяють деградації макромолекул сполучної тканини [2, 11].

За умов активації процесів ПОЛ, велике значення має функціональна активність внутрішньоклітинних захисних систем, до яких належить антиоксидантна система (АОС), яка становить сукупність захисних механізмів клітин, тканин, органів та систем, направлених на збереження і підтримку гомеостазу в організмі [6, 11, 12]. АОС представлена комплексом ферментних і неферментних антиоксидантів. До складу ферментної ланки належать каталази, супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза. Ключовим ферментом АОС є каталаза, яка відноситься до першої лінії захисту від активних форм кисню і локалізована переважно в пероксисомах клітини [11, 12]. У зв'язку з цим вивчення динаміки прооксидантно-антиоксидантного статусу при ЦД дозволить патогенетично обґрунтовано здійснювати заходи корекції.

Мета дослідження. Вивчити стан прооксидантно-антиоксидантної систем крові у білих щурів при експериментальному цукровому діабеті.

Матеріали і методи. Експерименти виконані на 88-ми білих щурах-самцях лінії Вістар масою 170-210 г, яких утримували на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до води. Тварини були

розділені на три групи: 1 – інтактна (n=10); 2 – контрольна (n=40); 3 – експериментальна (n=38) з моделлю цукрового діабету, який відтворювали шляхом внутрішньоочеревинного введення стрептозотоцину фірми «Sigma» (США), розведеного в 0,1 М цитратному буфері з рН 4,5 з розрахунку 60 мг/кг маси тіла. Контрольній групі тварин внутрішньоочеревинно вводили еквівалентну дозу 0,1 М цитратного буферного розчину з рН 4,5.

Утримання тварин та дослідження проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013).

Усі дослідження здійснювались під тіопенталнатрієвим знеболенням із розрахунку 60 мг/кг ваги. Забір крові для біохімічного дослідження проводили через 14, 28, 42 і 70 діб після ін'єкції стрептозотоцину. Вміст ДК визначали за методом [13], каталази – за методом [14].

При проведенні статистичної обробки отриманих результатів була використана програма STATISTICA 10. З допомогою можливостей описової статистики усі отримані в дослідженні кількісні дані

спочатку перевірили на тип їх розподілу за тестом Шапіро-Уїлка. Оскільки абсолютна більшість цих даних відповідала нормальному закону Гауса, для описання центральної тенденції обрано середнє арифметичне \pm стандартна похибка ($M \pm m$), а для оцінки достовірності відмінностей отриманих результатів у групах порівняння (дослідна і контрольна) та перевірки нульової гіпотези – параметричний t-тест (критерій Стьюдента). Для оцінки достовірності змін даних у динаміці (14, 28, 42, 70 діб) усередині кожної з груп порівняння застосували непараметричний метод для трьох і більше груп порівняння – дисперсійний аналіз Фрідмана та коефіцієнт конкордантності Кендала (Friedman ANOVA and Kenall Coef. of Concordance).

Результати дослідження та їх обговорення. Проведені нами біохімічні дослідження сироватки крові показали, що у тварин з ЦД відзначається підвищення рівня ДК, порівняно з аналогічними показниками у групі контрольних тварин, на всіх етапах експерименту (табл. 1, рис. 1). Зокрема було встановлено достовірне збільшення вмісту ДК у сироватці крові на 31,8% ($p < 0,001$) через 14 діб після моделювання ЦД. На цей термін дослідження спостерігалася активація антиоксидантної системи, про що свідчить підвищення у сироватці крові концентрації каталази на 46,6% ($p < 0,001$) порівняно з показником контрольної групи тварин (табл. 2, рис. 2).

Таблиця 1

Вміст ДК (у.о.) у сироватці крові білих щурів при експериментальному цукровому діабеті

Група	14 діб		28 діб		42 доби		70 діб		p ₂
	M	$\pm m$	M	$\pm m$	M	$\pm m$	M	$\pm m$	
Дослід	0,236*	0,002	0,372*	0,008	0,391*	0,005	0,408*	0,009	<0,001
Контроль	0,179	0,002	0,182	0,001	0,184	0,001	0,181	0,001	>0,05
p ₁	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		x
Інтактні	0,183 \pm 0,01								

Примітка: p₁ – достовірність різниці даних дослідної і контрольної груп.

p₂ – достовірність даних всередині групи в динаміці.

* – достовірність різниці даних порівняно з інтактною групою.

Таблиця 2

Активність каталази (мгН₂О₂ /мл) у сироватці крові білих щурів при експериментальному цукровому діабеті

Група	14 діб		28 діб		42 доби		70 діб		p ₂
	M	$\pm m$	M	$\pm m$	M	$\pm m$	M	$\pm m$	
Дослід	9,22*	0,08	10,80*	0,14	8,17*	0,15	4,41*	0,10	<0,01
Контроль	6,29	0,10	6,18	0,10	6,32	0,11	6,13	0,09	>0,05
p ₁	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		x
Інтактні	6,24 \pm 0,08								

Примітка: p₁ – достовірність різниці даних дослідної і контрольної груп.

p₂ – достовірність даних всередині групи в динаміці.

* – достовірність різниці даних порівняно з інтактною групою.

Через 28 діб експерименту визначалося подальше збільшення концентрації ДК на 104,4% ($p < 0,001$) порівняно з аналогічним показником у групі контрольних тварин. Необхідно зазначити, що у цей період дослідження (28 діб) у сироватці крові щурів дослідної

групи встановлено найвищий рівень каталазної активності. Величина досліджуваного ензиму була на 74,8% ($p < 0,001$) більшою порівняно з показником контрольної групи тварин і на 28,2% більшою порівняно з попереднім етапом експерименту.

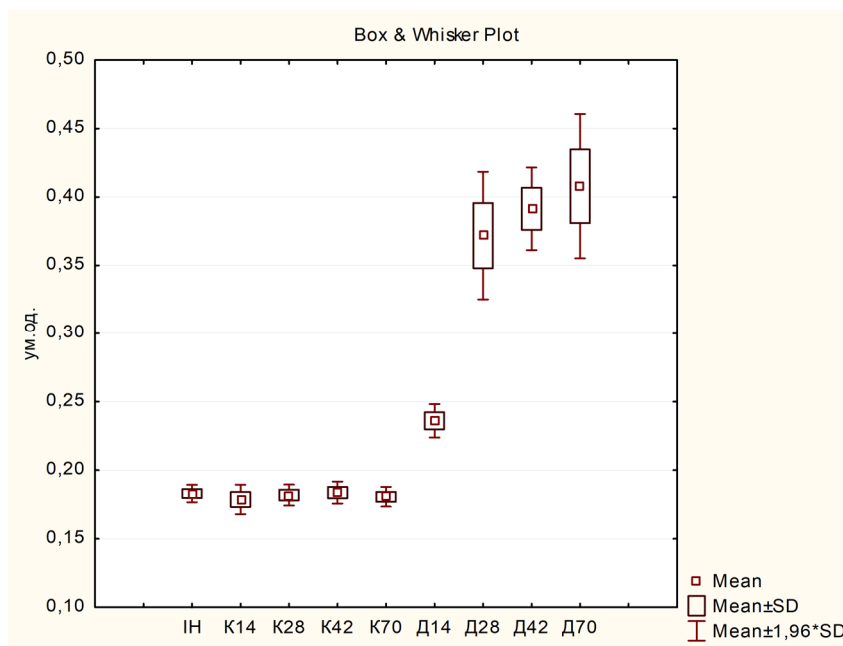


Рис. 1. Динаміка вмісту ДК (у.о.) у сироватці крові білих щурів при експериментальному цукровому діабеті.

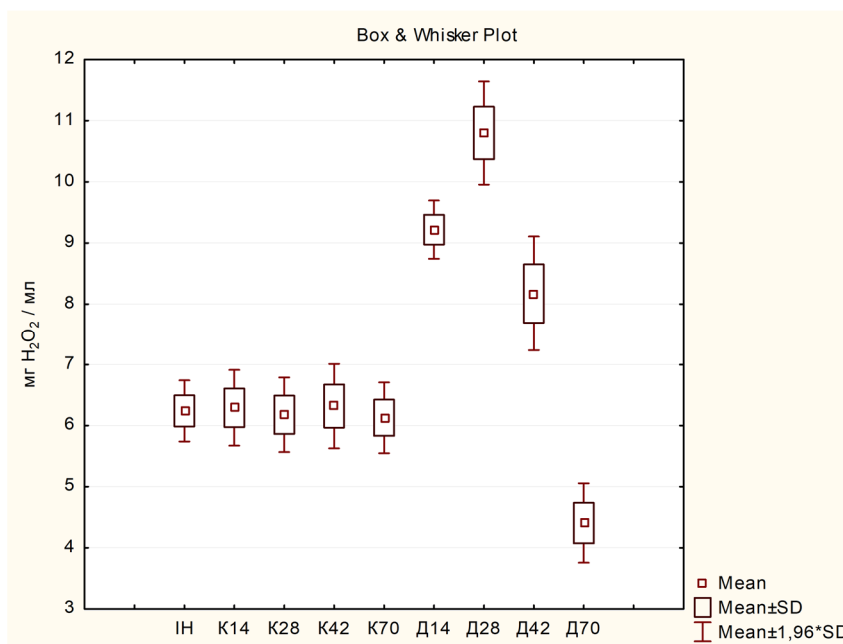


Рис. 2. Динаміка активності каталази (мг H₂O₂/мл) у сироватці крові білих щурів при експериментальному цукровому діабеті.

Зі збільшенням терміну дослідження (42 доби) рівень первинних продуктів перекисного окиснення ліпідів у сироватці крові достовірно зростає і перевищує величину цього показника контрольної групи тварин на 112,5% ($p < 0,001$). Водночас активність каталази сироватки крові зростає на 29,3% ($p < 0,01$) щодо показника контрольної групи тварин. Проте порівняно з попереднім етапом експерименту активність каталази у сироватці крові зменшилася на 45,5%. Вивчення вмісту ДК у сироватці крові через 70 діб в умовах змодельованого ЦД показало подальше зростання даного ензиму. Так, рівень цього показника збільшувався і перевищував величину контролю на 125,4% ($p < 0,001$).

Водночас спостерігалось зменшення активності каталази на 28,1% ($p < 0,01$) у сироватці крові порівняно з показником контрольної групи тварин.

Результати наших біохімічних досліджень сироватки крові свідчать про дисбаланс у рівновазі між процесами перекисного окиснення ліпідів і системою антиоксидантного захисту. Встановлено, що в умовах змодельованого ЦД спостерігається активація процесів ліпопероксидації протягом усього періоду спостереження, про що свідчить збільшення рівня у сироватці крові діенових кон'югатів. На інтенсифікацію процесів вільнорадикального окиснення ліпідів при ЦД вказують і ряд інших дослідників [5, 7, 15]. Також

виявилися порушення в системі антиоксидантного захисту, яка у нормі контролює і обмежує активність процесів ПОЛ. До основних ензимів ферментної ланки АОС належить каталаза. Згідно з результатами наших досліджень у тварин із цукровим діабетом вміст каталази у сироватці крові зростає на 46,6%, 74,8% і 29,3% відповідно на 14, 28 і 42 доби дослідження. Найбільш інтенсивний приріст активності каталази спостерігається на 28-му добу експерименту. Імовірно, таке компенсаторне підвищення активності каталази в сироватці крові обумовлено інтенсифікацією процесів ліпопероксидації. Водночас дослідження активності каталази на 70-ту добу експерименту показало зменшення цього ендogenous ензиму антиоксидантного захисту в сироватці крові на 28,1% ($p < 0,01$) щодо показника контрольної групи тварин.

Як свідчать отримані результати, зменшення каталазної активності вказує на виснаження ключових компонентів ензимної ланки антиоксидантної системи.

На зміни аналогічного характеру вказують і ряд інших дослідників при дії ендogenous факторів [6, 7].

Висновки. Експериментальний цукровий діабет протягом усього періоду дослідження супроводжується інтенсифікацією процесів ліпопероксидації, що проявляється достовірним підвищенням у сироватці крові вмісту дієнових кон'югатів. На тлі розвитку цукрового діабету у сироватці крові відзначається виснаження ферментної ланки антиоксидантної системи, про що свідчить зменшення каталазної активності, яка особливо виражена на 70-ту добу експерименту.

References:

1. Kresiun NV, Hodlevskiy LS, Son HO. Stan membran mitochondrii pechinky shchuriv pry tsukrovomu diabetei ta medykametoznii korektsii. Odeskyi medychnyi zhurnal. 2017; 1(159):5-12.
2. Zheng H, Wu J, Jin Z, Yan L-J. Potential biochemical mechanisms of lung injury in diabetes. Aging and disease. 2017; 1(8):7-16. DOI: 10.14336/AD.2016.0627
3. Simo R, Lecube A. Looking for solutions to lung dysfunction in type 2 diabetes. Ann Transl Med. 2020; 8(8):521. DOI: 10.21037/atm.2020.03.225
4. Kuziemski K, Slominski W, Jassem E. Impact of diabetes mellitus on functional exercise capacity and pulmonary functions in patients with diabetes and healthy. BMC Endocrine disorders. 2019; 19:2. DOI: 10.1186/s12902-018-0328-1
5. Detsyk OI, Panchyshyn OB, Fomenko IS, Bondarchuk TI, Skliarov PO, Ilnytska KhM ta in. Nitrozo-oksodyatyvni protsesy v orhanakh travnoi systemy pry dii L-arhininu ta aminohuanidynu za umov eksperymentalnoho tsukrovoho diabeteu. Art of Medicine. 2021; 2(18):44-49.
6. Martyshchuk TV. Vplyv oksydatsiinoho stresu na systemu antyoksydantnoho zakhystu orhanizmu shchuriv. Visnyk Dnipropetrovskoho universytetu. Biolohiia, medytsyna. Dnipro. 2016; 7(1):8-12.
7. Stechyshyn IP, Dub AI. Antyoksydantna ta hipohlikemichna aktyvnist bioflavonoidiv za tsukrovoho diabeteu II typu. Farmakolohiia ta likarska toksykolohiia. 2017; 6(56):15-22.
8. Shevchuk OO, Volska AS, Yaremchuk OZ, Kurylo KhI, Bardakhivska KI, Nikolaiev VH ta in. Protooksydantno-antyoksydantnyi balans v orhanizmi shchuriv na tli subkhronichnoi doksorubitsynovoi toksychnosti ta zastosuvannia enterosorbtsii i filhrastymu. Medychna ta klinichna khimii. 2019; 3(21):13-21. DOI: 10.11603/mcch.2410-681X.2019.v.i3.10555
9. Luo X, Wu J, Jing S, Yan LJ. Hyperglycemic Stress and Carbon Stress in Diabetic Glucotoxicity. Aging Dis. 2016; 7(1):90-110. DOI: 10.14336/AD.2015.0702.
10. Wu J, Jin Z, Zheng H, Yan LJ. Sources and implications of NADH/NAD⁺ redox imbalance in diabetes and its complications. Diabetes Metab Syndr Obes. 2016; 9:145-153. DOI: 10.2147/DMSO.S106087
11. Hovoruha OYu, Shnaiderman OYu. Znachennia vzajemodii perekysnoho okysnennia lipidiv i antyoksydantnykh system v rozvytku patalohichnykh protsesiv. Eksperymentalna i klinichna medytsyna. 2016; 4(73):10-14.
12. Damiani E, Donati A, Girardis M. Oxygen in the critically ill: friend or foe? Curr. Opin. Anaesthesiol. 2018; 31(2):129-135. DOI: 10.1097/ACO.0000000000000559.
13. Havrylov VB, Havrylova AR, Khmara YF. Vymiruvannia diienovykh koniuhativ v plazmi krovi po IF-pohlynanniu heptanovykh i izopropanovykh ekstraktiv. Laboratornoe delo. 1988; 2:60-3.
14. Bakh AN. Sbornik izbrannykh trudov. Bakh AN, Zubkova SA, redaktor Bakh AN, L: 1997. P.412-415.
15. Anupam K, Kaushal J, Prabhakar N, Bhatnagar A. Effect of redox status of peripheral blood on immune signature of circulating regulatory and cytotoxic T cells in streptozotocin induced rodent model of type I diabetes, Immunobiology. 2018; 223:586-597. DOI: 10.1016/j.imbio.2018.07.004.

UDC 616.24+616.092.9+616.379-008.64

STATE OF PROOXIDANT AND ANTIOXIDANT BLOOD SYSTEMS IN WHITE RATS WITH EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

L.M. Zaiats, Yu.V. Fedorchenko

*Ivano-Frankivsk National Medical University,
Department of Pathophysiology
Ivano-Frankivsk, Ukraine,
ORCID ID: 0000-0003-3265-1273,
ORCID ID: 0000-0002-5042-1191,
e-mail: juliakozubash@gmail.com*

Abstract. Aim of the research: to study the state of prooxidant-antioxidant blood systems in white rats with experimental diabetes mellitus. Recent researches have shown that one of the important links in the pathogenesis of diabetes is a violation of the processes of free radical oxidation of lipids and weakening of antioxidant defenses. It is known that the primary products of lipid peroxidation are diene conjugates - the result of oxidation of polyunsaturated higher fatty acids at the stage of formation

and realization of free radicals that have a damaging effect on lipids, proteins and enzymes. Under the conditions of lipid peroxidation processes activation, the functional activity of intracellular defense systems is the great importance, which includes the antioxidant system - a complex of enzymatic and non-enzymatic antioxidants. The key enzyme of the antioxidant system is catalase, which belongs to the first line of defense against reactive oxygen species. Therefore, the study of the dynamics of prooxidant-antioxidant status in experimental diabetes will be able to provide pathogenetically justified corrective measures.

Materials and methods. The experiments were performed on 88 white male Wistar rats weighing 170-210 g, that were kept on a standard diet with free access to water. Animals were divided into three groups: 1 - intact (n = 10); 2 - control (n = 40); 3 - experimental (n = 38) with a model of diabetes mellitus, which was reproduced by intraperitoneal injection of streptozotocin by "Sigma" company (USA), diluted in 0.1 M citrate buffer with a pH of 4.5, at a rate of 60 mg / kg body weight. The control group of animals received an intraperitoneal injection with an equivalent dose of 0.1 M citrate buffer solution with a pH of 4.5.

Serum levels of diene conjugates and catalase activity were measured on 14th, 28th, 42nd and 70th day after streptozotocin injection.

Results. The conducted biochemical analysis showed that 14 days after diabetes modeling there was an increase in serum of diene conjugates levels by 31.8% ($p < 0.001$) and catalase concentration by 46.6% ($p < 0.001$) relative to the control group of animals. After 28 days of the experiment, a further increase in the concentration of diene conjugates by 104.4% ($p < 0.001$) and catalase activity by 74.8% ($p < 0.001$) was determined, compared to the control group of animals. With increasing study time (42 days), the level of primary products of lipid peroxidation in serum increased by 112.5% ($p < 0.001$). The activity of serum catalase was increased by 29.3% ($p < 0.01$). After 70 days, the level of diene conjugates increased and exceeded the control value by 125.4% ($p < 0.001$). At the same time, there was a decrease in catalase activity by 28.1% ($p < 0.01$) in serum compared to the control group of animals.

Conclusions. Experimental diabetes mellitus is accompanied by an intensification of lipoperoxidation processes throughout the study period, which is manifested by a significant increase in serum levels of diene conjugates. On the background of diabetes mellitus development there is depletion of the enzymatic link of the antioxidant system in the serum, as evidenced by a reduction in catalase activity, which is especially expressed on the 70th day of the experiment.

Keywords: streptozotocin-induced diabetes, diene conjugates, catalase.

Стаття надійшла в редакцію 03.02.2022 р.

Стаття прийнята до друку 14.03.2022 р.