

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Сарахан Василь Миколайович

УДК 616.379-008.64-06.616]-092-08

ДИСЕРТАЦІЯ

**Патогенетично обґрунтована корекція ендотеліальної дисфункції при
цукровому діабеті з метою запобігання мікроциркуляторних ускладнень**

22 – охорона здоров'я

222 – медицина

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

В. М. Сарахан

Науковий керівник Савицький Іван Володимирович,
доктор медичних наук, професор

Одеса – 2021

АНОТАЦІЯ

Сарахан В. М. Патогенетично обґрунтована корекція ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті з метою запобігання мікроциркуляторних ускладнень. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина». – Одеський національний медичний університет МОЗ України, Одеса, 2021.

Дисертаційна робота присвячена комплексному дослідженню патогенетичних ланок пізніх діабетичних ускладнень, а також розробці патогенетично обґрунтованого ефективного методу корекції даних нозологічних станів.

Цукровий діабет є важким соціально-економічним тягарем для будь-якої країни світу та посідає одне із провідних місць в рейтингу хронічних захворювань. Згідно прогнозам ВООЗ до 2040 року кількість осіб, що страждають на цукровий діабет віком 20-79 років, збільшиться до 642 мільйонів. Розвиток гіперглікемічних ускладнень суттєво знижує якість та тривалість життя пацієнта, його працездатність. Найсерйозніша небезпечність цукрового діабету пов'язана із ускладненнями, що розвиваються при пошкоджуючій дії на судини. Важливе місце серед хронічних діабетичних ускладнень займає діабетична нефропатія, яка є однією із провідних причин розвитку термінальної ниркової недостатності.

Експериментальні дослідження виконані на 114 нелінійних щурах обох статей, вирощених у розпліднику віварію Одеського національного медичного університету Міністерства охорони здоров'я України. Досліди з тваринами проводили згідно встановленим правилам роботи з ними. Всі маніпуляції, які викликали біль, були проведені під етамінал-натрієвим наркозом.

Для моделювання цукрового діабету 2-го типу була обрана стрептозотоцинова модель, так як вона дозволяє відтворити основні

патогенетичні ланки цукрового діабету 2-го типу у людини. Дослідження діабетичних ускладнень із боку ниркового апарату проводили шляхом введення в раціон експериментальних тварин високожирової їжі.

Літературний пошук вітчизняних та зарубіжних наукових джерел дозволив встановити, що одними із основних маркерів розвитку діабетичної нефропатії на тлі інсулінонезалежного цукрового діабету є порушення з боку функціональної активності ендотелію, антиоксидантного захисту та цитокінового профілю. Однак, комплексних досліджень, які присвячені повній оцінці та динаміці змін системи дисфункції ендотелію, систем перекисного окиснення ліпідів та оксидативного стресу, а також змін цитокінового профілю та гострофазових показників у щурів при експериментальному моделюванні пізніх мікроангіопатичних ускладнень на тлі цукрового діабету 2-го типу не має.

Встановлено, що у тварин із модельованим стрептозотоциновим діабетом, які знаходилися на високожировому раціоні харчування відмічали більш виражені зміни функціонального стану організму порівняно із тваринами, яким відтворювали цукровий діабет 2-го типу. При експериментальному стрептозотоцинову діабеті та при мікросудинних ускладненнях на тлі діабету відмічалися підвищення рівня виділення білка із сечею та кліренс креатиніну, незначні зміни клубочкової фільтрації та канальцевої реабсорбції. Однак як при цукровому діабеті 2-го типу, так і при діабетичній нефропатії відмічали достовірні зміни процесів екскреції із сечею іонів натрію та калію, що пов'язано із зниження реабсорбції даних катіонів в канальцях нирок. При морфологічному дослідженні тканини нирок встановлено, що у групі тварин із діабетичною нефропатією на тлі цукрового діабету 2-го типу відмічалось зменшення розмірів ниркових тілець із дистрофічними зміненими клітинами зовнішньої та внутрішньої стінок капсули клубочка, вогнищеве стовщення базальної мембрани капілярів клубочка, розширення мезангія.

При вивченні показників, що характеризують дисфункцію ендотелію встановлено, що порушення балансу регуляції тонуусу судин, системи гемостазу

та процесів міжклітинної взаємодії призводить до підвищення концентрації ендотеліну-1 та різкого підвищення викиду фактора фон Віллебранда. У щурів, яким відтворювали діабетичну нефропатію на тлі стрептозотоцинового цукрового діабету спостерігалось різке зниження рівня ендотеліальної синтази оксиду азоту та компенсаторне підвищення індукцйбельної синтази оксиду азоту, що вказувало на формування значних змін ендотелію судин при експериментальному цукровому діабеті.

Активація прозапальних цитокінів, яким притаманна цитотоксична дія на ендотелій, посилює запальний процес, зумовлюючи осідання імунних комплексів на стінку судин, внаслідок чого посилюється прогресування ушкоджуючої дії на нирковий апарат. Встановлено, що при діабетичній нефропатії у щурів спостерігається значне підвищення рівня прозапальних цитокінів (ІЛ-1 β , ІЛ-2) та компенсаторне підвищення рівня протизапального цитокіну (ІЛ-4), що вказує на переважання прозапальних властивостей крові над протизапальними. За рахунок того, що рівень ІЛ-4 залишається на низькому рівні це дає змогу прозапальним цитокінам стимулювати судинне запалення. Можна вважати, що прозапальна група цитокінів виступає предиктором хронічних ускладнень на тлі цукрового діабету 2-го типу.

При експериментальному стрептозотоциновому діабеті спостерігалось значне підвищення рівнів гострофазових показників (С-реактивного білка, фактора некрозу пухлин α , фібриногену та резистину). Однак більш виражені зміни даних показників спостерігалися у групі щурів, які знаходилися на високожировому раціоні харчування.

Один із пускових та ключових патофізіологічних механізмів при цукровому діабеті, який призводить до розвитку судинних та органних порушень є оксидативний стрес. Встановлено, що при діабетичній нефропатії на тлі цукрового діабету 2-го типу відмічалось різке підвищення рівня дієнових кон'югатів, ТБК-активних продуктів та зниження концентрації вільного глутатіону. Аналіз показників перекисного окиснення ліпідів дозволив свідчити про підвищення рівня малонового диальдегіду та зниження рівня каталази як у

тварин з експериментальним цукровим діабетом, так і у щурів з діабетичною нефропатією на тлі цукрового діабету 2-го типу. Варто відмітити тенденцію до більш вираженого окисного стресу у щурів із діабетичними мікросудинними ускладненнями цукрового діабету 2-го типу, яку можна пояснити тим, що окрім гіперглікемії у даних тварин надлишкове утворення вільних радикалів сприяє метаболічним зсувам в ішемізованих зонах тканин та органів.

Отже, надлишкова генерація вільних радикалів призводить до розвитку ендотеліальної дисфункції, модифікації ліпопротеїнів та активації запального процесу. Порушення балансу антиоксидантного захисту та перекисного окиснення ліпідів при цукровому діабеті 2-го типу запускає патогенетичний каскад розвитку ускладнень мікроциркуляторного русла та супроводжується тенденцією до ще більшого посилення генерації активних форм кисню і активації перекисного окиснення ліпідів.

Незважаючи на стрімкий розвиток фармакотерапії у лікуванні цукрового діабету та його пізніх ускладнень залишається актуальною залишається профілактика мікро- та макроангіопатичних уражень за рахунок використання лікарських засобів природного походження.

Оскільки в патогенезі діабетичної нефропатії на тлі цукрового діабету 2-го типу однією із ключових ланок є порушення системи антиоксидантного захисту та функціональної активності ендотелію доцільним було вивчення ефективності застосування біофлавоноїдів в комплексі з L-аргініном протягом 30 діб.

При вивченні впливу антиоксидантної терапії та L-аргініну на тлі застосування метформіну на показники, що характеризують ендотеліальну дисфункцію встановлено, що рівень ендотеліну-1 на 15 добу експерименту знижувався відносно показників групи тварин з діабетичною нефропатією. Однак, найбільш виражені зміни досліджуваного показника спостерігали на 30 добу після початку застосування досліджуваної терапії. При вивченні рівня фактора фон Віллебранда встановлено, що введення в якості додаткової терапії біофлавоноїдів та L-аргініну призводило до зниження рівня досліджуваного

показника відносно показників групи тварин з контрольною патологією вже на 15 добу.

Застосування додаткової антиоксидантної терапії у комплексі з L-аргініном протягом 30 діб призводило до достовірного підвищення рівня ендотеліальної синтази оксиду азоту та зниження рівня індукцибельної синтази порівняно із групою щурів з мікроангіопатичними ускладненнями на тлі цукрового діабету 2-го типу. Одержані результати вказують на виражені ендотелійпротекторні властивості, що, ймовірно, обумовлені дією L-аргініну та посиленням ефекту за рахунок біофлавоноїдів рослинного походження, яким притаманні виражені антиоксидантні властивості.

Вивчення ефективності терапії на рівень прозапальних цитокінів, гострофазових показників при діабетичній нефропатії на тлі цукрового діабету 2-го типу дозволило встановити, що введення антиоксидантної терапії у комплексі з L-аргініном протягом 30 діб призводило до зниження рівня прозапальних цитокінів порівняно із аналогічними даними як у групі щурів, які отримували терапію метформіном (60 мг/кг), так і у групі тварин, яким застосовували в якості додаткової терапії введення біофлавоноїдів та L-аргініну на 15 добу дослідження. Введення антиоксидантної терапії у комплексі з L-аргініном протягом 30 діб також призводило до значних змін гострофазових показників. Зокрема, відмічалось достовірне зниження С-реактивного білка, фактору некрозу пухлин- α , фібриногену та резистину. Аналіз одержаних результатів свідчить про виражений вплив запропонованої антиоксидантної терапії у комплексі з L-аргініном протягом 30-добового введення на прогресування діабетичної нефропатії на тлі цукрового діабету 2-го типу за рахунок зниження рівня прозапальних цитокінів та концентрації гострофазових показників.

Застосування антиоксидантної терапії та L-аргініну на тлі застосування метформіну (60 мг/кг) призводило до врівноваження показників, що характеризують антиоксидантний захист та перекисне окиснення ліпідів у

щурів із діабетичною нефропатією на тлі цукрового діабету 2-го типу вже на 15 добу після початку введення досліджуваних сполук.

Одержані експериментальні дані перевищували всі показники групи тварин, яким вводили метформін (60 мг/кг), що свідчить про доцільність використання в якості додаткової терапії введення біофлавоноїдів та L-аргініну протягом 30 діб на тлі застосування цукрознижувальних препаратів.

Таким чином, проведені дослідження вказують на доцільність застосування в якості додаткової терапії біофлавоноїдів в комплексі з L-аргініном протягом 30 діб на тлі застосування цукрознижувальних препаратів, що дозволить вплинути на патогенетичний механізм розвитку пізніх ускладнень цукрового діабету 2-го типу.

Ключові слова: цукровий діабет, мікроангіопатичні ускладнення, діабетична нефропатія, ендотеліальна дисфункція, антиоксидантна терапія.

Список публікацій здобувача

1. Експериментальне дослідження цукрового діабету: особливості методик моделювання / І. В. Савицький, В. М. Сарахан, І. А. Кузьменко, Н. В. Якимчук. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2017. № 6. С. 41–45. (Особистий внесок – брав участь в плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті до друку).

2. Correction of endothelial dysfunction among patients suffering from diabetes mellitus / I. V. Savitsky, V. N. Sarakhan, I. V. Miastkivska, V. I. Savitsky. *Journal of Education, Health and Sport*. 2017. Vol. 7 (1). P. 621–632. (Особистий внесок – здобувач особисто провів дослідження, здійснив статистичний аналіз і узагальнення матеріалу).

3. Reproduction of diabetes mellitus` types in an experiment / I. V. Savytskiy, I. A. Kuzmenko, V. M. Sarahan, N. V. Yakymchuk. *World Science*. 2018. Vol. 3, № 1. P. 49–51. (Особистий внесок – брав участь в плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті до друку).

4. Bioflavonoids complex using in the prevention and treatment of diabetes complications / I. I. Hrytsan, I. V. Savytskyi, V. M. Sarakhan et al. *PharmacologyOnLine*. 2020. December, 30. P. 279–283. (Особистий внесок – брав участь в патентному пошуку, проведенні експериментальних досліджень та підготовці статті до друку).

5. Сарахан В. М., Савицький В. І. Способи дослідження цукрового діабету в експерименті. *Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини (для молодих вчених та студентів)*: науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 100-річчю з дня народження С. І. Корхова. Одеса, 19-20 квітня 2018 р. с. 41.

6. Моделювання експериментального цукрового діабету / В. М. Сарахан, Н. В. Якимчук, І. А. Кузьменко, І. В. Савицький. *Перспективи розвитку медичної науки і освіти* : збірник тез доповідей Всеукраїнської науково-методичної конференції, присвяченої 25-річчю Медичного інституту Сумського державного університету, м. Суми, 16–17 листопада 2017 року. Суми: Сумський державний університет, 2017. с. 81.

7. Патогенетичне обґрунтування метаболічної терапії ускладнень цукрового діабету / І. А. Кузьменко, І. В. Савицький, В. М. Сарахан, В. І. Савицький. *Науково-практична конференція: «Патофізіологія нирок та водно-сольового гомеостазу»*, м. Одеса, 15 – 16 лютого 2018 р. – Одеса.

8. Modeling of experimental diabetes mellitus / V. M. Sarakhan et al. *Інтегративні механізми патологічних процесів: від експериментальних досліджень до клінічної практики: Матеріали VII Пленуму Українського наукового товариства патофізіологів та науково-практичної конференції, присвячених 110-річчю з дня народження члена-кореспондента АМН СРСР, професора М. Н. Зайка*, м. Полтава, 11-12 жовтня 2018 р. УМСА. - Полтава : РВВ УМСА, 2018. С. 76–77.

ANNOTATION

Sarakhan V. M. Pathogenetically substantiated correction of endothelial dysfunction in diabetes mellitus aimed at prevention of microcirculatory complications.

The thesis for a candidate of medical science degree in speciality 222-«Pathological physiology». – Odessa National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Odessa, 2021.

The thesis is devoted to the complex research of pathogenetic links of late diabetic complications, as well as to the development of pathogenetically substantiated effective method of correction of these nosological conditions.

Diabetes is a heavy socio-economic burden for any country in the world and occupies one of the leading positions in the ranking of chronic diseases. According to WHO, by 2040 the number of people suffering from diabetes aged 20-79 years will increase to 642 million. The development of hyperglycemic complications significantly reduces the quality and duration of life of the patient, his ability to work. The most serious risk of diabetes is associated with complications that develop when the blood vessels are damaged. An important place among chronic diabetic complications is diabetic nephropathy, which is one of the leading causes of end-stage renal disease.

Experimental studies were performed on 114 nonlinear rats raised in the vivarium of Odessa National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine. Experiments with animals were carried out according to the established rules of work with them. All manipulations that caused pain were performed under etaminal-sodium anesthesia.

Streptozotocin model was chosen to reproduce type 2 diabetes mellitus, as it allows to reproduce the main pathogenetic links of type 2 diabetes mellitus in humans. Studies of diabetic complications of the renal apparatus were performed by introducing into the diet of experimental animals high-fat food.

Literary search of domestic and foreign scientific sources revealed that one of the main markers of diabetic nephropathy on the background of non-insulin dependent diabetes mellitus is a violation of the functional activity of the endothelium, antioxidant protection and cytokine profile. However, comprehensive studies on the complete assessment and dynamics of changes in endothelial dysfunction, lipid peroxidation and oxidative stress, as well as changes in cytokine profile and acute phase parameters in rats in experimental modeling of late microangiopathic complications on the background of type 2 diabetes mellitus.

It was found that animals with simulated streptozotocin diabetes, which were on a high-fat diet had more pronounced changes in the functional state of the body compared with animals that reproduced type 2 diabetes. There was increase in urinary protein excretion and creatinine clearance, minor changes in glomerular filtration and tubular reabsorption in experimental streptozotocin diabetes and in microvascular complications on the background of diabetes. However, in type 2 diabetes and DN, significant changes in the urinary excretion of sodium and potassium ions were observed, which is associated with decrease in the reabsorption of these cations in the renal tubules. Morphological examination of renal tissue revealed that in the group of animals with DN on the background of type 2 diabetes there was decrease in the size of renal corpuscles with dystrophic altered cells of the outer and inner walls of the glomerular capsule, focal thickening of BM capillaries, expansion of the mesangium.

In studying of the indicators that characterize endothelial dysfunction, it was found that the violation of the vascular tone regulation balance, hemostasis and intercellular interaction leads to increased concentrations of endothelin-1 and a sharp increase in the release of von Willebrand factor. Rats treated with diabetic nephropathy on the background of streptozotocin diabetes mellitus have sharp decrease in the level of endothelial nitric oxide synthase and compensatory increase in inducible nitric oxide synthase were observed, which indicated the formation of significant changes in vascular endothelium in experimental diabetes.

Activation of pro-inflammatory cytokines, which have cytotoxic effect on the endothelium, enhances the inflammatory process, causing the deposition of immune

complexes on the vascular wall, resulting in increased progression of the damaging effect on the renal apparatus. It was found that in rats with DN have significant increase of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-2) level and compensatory increase of anti-inflammatory cytokine (IL-4) level which indicates the predominance of pro-inflammatory properties of blood over anti-inflammatory. Due to the fact that the level of IL-4 remains low, this allows pro-inflammatory cytokines to stimulate vascular inflammation. We can assume that the pro-inflammatory group of cytokines acts as predictors of chronic complications on the background of type 2 diabetes.

In experimental streptozotocin diabetes significant increase in the levels of acute phase parameters (C-reactive protein, tumor necrosis factor α , fibrinogen and resistin) was observed. However, more pronounced changes in these indicators were observed in the group of rats that were on a high-fat diet.

One of the triggering and key pathophysiological mechanisms in diabetes, which leads to the development of vascular and organ disorders, is oxidative stress. It was found that in diabetic nephropathy on the background of type 2 diabetes there was a sharp increase in the level of diene conjugates, TBA-active products and a decrease in the concentration of free glutathione. Analysis of lipid peroxidation showed increase in malonic dialdehyde and decrease in catalase levels in both animals with experimental diabetes mellitus and rats with diabetic nephropathy on the background of type 2 diabetes mellitus. It is worth noting the tendency to more pronounced oxidative stress in rats with diabetic microvascular complications of type 2 diabetes, which can be explained by the fact that in addition to hyperglycemia excessive formation of free radicals promotes metabolic shifts in ischemic areas of tissues and organs.

Thus, excessive generation of free radicals leads to the development of endothelial dysfunction, modification of lipoproteins and activation of the inflammatory process. Imbalance in antioxidant protection and lipid peroxidation in type 2 diabetes triggers the pathogenetic cascade of the microcirculatory system complications and is accompanied by tendency to further increase the generation of reactive oxygen species and activation of lipid peroxidation.

Despite the rapid development of pharmacotherapy in the diabetes mellitus treatment and its late complications, the prevention of micro- and macroangiopathic lesions through the use of drugs of natural origin remains relevant.

Since in diabetic nephropathy pathogenesis of on the background of type 2 diabetes mellitus one of the key links is a violation of the antioxidant defense system and functional activity of the endothelium, it was advisable to study the effectiveness of bioflavonoids in combination with L-arginine for 30 days.

When studying the effect of antioxidant therapy and L-arginine on the background of metformin on the indicators characterizing ED, it was found that the level of endothelin-1 on the 15th day of the experiment decreased relative to the group of animals with DN. However, the most pronounced changes in the studied indicator were observed on day 30 after the start of studying therapy. In the study of von Willebrand factor, it was found that the introduction as an adjunct therapy of bioflavonoids and L-arginine led to decrease in the level of the studied indicator relative to the indicators of the group of animals with control pathology for 15 days.

The use of additional antioxidant therapy in combination with L-arginine for 30 days led to significant increase in the level of endothelial nitric oxide synthase and decrease in the level of inducible synthase compared with group of rats with microangiopathic complications of type 2 diabetes. The obtained results indicate the pronounced endothelial protective properties, which is probably due to the action of L-arginine and the strengthening of the effect due to the combined bioflavonoids with pronounced antioxidant properties.

The study of the effectiveness of therapy on the proinflammatory level cytokines, acute phase indicators in diabetic nephropathy on the background of type 2 diabetes revealed that the introduction of antioxidant therapy in combination with L-arginine for 30 days led to decrease in proinflammatory cytokines compared with analogues. The introduction of antioxidant therapy in combination with L-arginine for 30 days also led to significant changes in acute phase parameters. There was significant decrease in C-reactive protein, tumor necrosis factor- α , fibrinogen and resistin. The analysis of the obtained results testifies to the pronounced effect of the

proposed antioxidant therapy in combination with L-arginine during 30-day administration on the progression of diabetic nephropathy on the background of type 2 diabetes mellitus by reducing the level of proinflammatory cytokines and acute phase concentrations.

The use of antioxidant therapy and L-arginine on the background of the use of metformin (60 mg/kg) led to balance of indicators characterizing the antioxidant protection and lipid peroxidation in rats with diabetic nephropathy on the background of type 2 diabetes after the beginning of the introduction of the test compounds.

The obtained experimental data exceeded all indicators of the group of animals administered metformin (60 mg/kg), which indicates the feasibility of using as adjunctive therapy the introduction of bioflavonoids and L-arginine for 30 days on the background of the use of antidiabetic drugs.

Thus, the studies indicate the feasibility of using as adjunctive therapy bioflavonoids in combination with L-arginine for 30 days on the background of the use of antidiabetic drugs, which will affect the pathogenetic mechanism of chronic complications of type 2 diabetes.

Key words: diabetes mellitus, microangiopathic complications, diabetic nephropathy, endothelial dysfunction, antioxidant therapy.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ		17
ВСТУП		19
РОЗДІЛ 1	ПІЗНІ МІКРОСУДИННІ УСКЛАДНЕННЯ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ: ЕПІДЕМІОЛОГІЧНІ ТА ПАТОГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ (Огляд літератури).....	25
1.1	Сучасні уявлення про патогенез хронічних ускладнень на тлі цукрового діабету 2-го типу....	25
1.2	Діабетична нефропатія: епідеміологічні аспекти, патогенез і фактори ризику.....	30
1.2.1	Дисфункція ендотелію та діабетична нефропатія....	39
1.2.2	Концепція системного та локального запалення в розвитку діабетичної нефропатії.....	42
1.3.	Фітозасоби в лікуванні цукрового діабету 2-го типу та його пізніх ускладнень	46
РОЗДІЛ 2	МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	50
2.1	Матеріали дослідження.....	50
2.2	Експериментальні моделі дослідження.....	50
2.3.	Методики дослідження.....	54
РОЗДІЛ 3	ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ НИРОК У ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЮ ДІАБЕТИЧНОЮ НЕФРОПАТІЄЮ НА ТЛІ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2-ГО ТИПУ.....	65
3.1.	Динаміка фізіологічних показників лабораторних тварин при діабетичній нефропатії на тлі цукрового діабету 2-го типу.....	65
3.2.	Зміни біохімічних показників крові при діабетичній нефропатії на тлі цукрового діабету 2-го типу.....	67

3.3.	Дослідження структурно-функціонального стану нирок за умов хронічної гіперглікемії.....	70
	Висновки до розділу 3	75
РОЗДІЛ 4	КОМПЛЕКСНЕ ВИВЧЕННЯ ПОКАЗНИКІВ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ – ОДНІЄЇ ІЗ КЛЮЧОВИХ ЛАНОК ПАТОГЕНЕЗУ МІКРОСУДИННИХ УСКЛАДНЕНЬ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2-ГО ТИПУ.....	77
4.1	Вивчення змін рівня ендотеліну-1 та фактора фон Віллебранда при діабетичній нефропатії на тлі цукрового діабету 2-го типу.....	78
4.2	Оцінка біохімічних маркерів ендотеліальної дисфункції: індукцйбельної NO-синтази та ендотеліальної NO-синтази при діабетичній нефропатії	80
	Висновки до розділу 4	83
РОЗДІЛ 5	ДОСЛІДЖЕННЯ СПІВВІДНОШЕННЯ ПРОТИ-ПРОЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ПРИ ДІАБЕТИЧНІЙ НЕФРОПАТІЇ НА ТЛІ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2-ГО ТИПУ.....	84
5.1	Зміни рівнів проти- і прозапальних цитокінів у щурів з діабетичною нефропатією	84
5.2	Вивчення рівня гострофазових білків у щурів з діабетичною нефропатією	87
5.3	Дослідження системи антиоксидантного захисту та перекисного окиснення ліпідів при діабетичній нефропатії на тлі цукрового діабету 2-го типу.....	90
5.4	Визначення активності ферментної системи	

глутатіону в еритроцитах.....	94
Висновки до розділу 5	96
РОЗДІЛ 6 ДОЦІЛЬНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ БІОФЛАВОНОЇДІВ ТА L-АРГІНІНУ З МЕТОЮ ПАТОГЕНЕТИЧНОЇ КОРЕКЦІЇ ДІАБЕТИЧНОЇ НЕФРОПАТІЇ.....	98
6.1 Вплив досліджуваної терапії біофлавоноїдів у комплексі з L-аргініном на загальний стан тварин та біохімічні показники.....	99
6.2 Оцінка можливостей проведеної терапії в корекції ендотеліальної дисфункції у щурів з діабетичною нефропатією.....	103
6.3 Вивчення ефективності терапії на рівень проти- і прозапальних цитокінів, гострофазових показників при діабетичній нефропатії.....	108
6.4 Вплив антиоксидантної терапії та L-аргініну на показники системи перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантний захист.....	113
Висновки до розділу 6	118
РОЗДІЛ 7. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	124
ВИСНОВКИ.....	137
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	141
ДОДАТКИ	163

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

eNOS	—	ендотеліальна NO-синтаза;
iNOS	—	індуцибельна NO-синтаза;
NF- κ B	—	універсальний фактор транскрипції;
TNF- α	—	фактор некрозу пухлин α ;
АОЗ	—	антиоксидантний захист;
АОС	—	антиоксидантна система;
АпоВ-ЛП	—	апо-В-вмісні ліпопротеїди;
АТ	—	артеріальний тиск;
АТФ	—	аденозинтрифосфат;
АФК	—	активні форми кисню;
БАД	—	біологічно активна добавка;
БМ	—	базальна мембрана;
ВГ	—	вільний глутатіон;
ДК	—	дієнові кон'югати;
ДН		діабетична нефропатія;
ЕД	—	ендотеліальна дисфункція;
ЕДТА	—	етилендіамінтетраацетат натрію;
КПГ	—	кінцеві продукти глікозилювання;
ЛПВЩ	—	ліпопротеїди високої щільності;
ЛПНЩ	—	ліпопротеїни низької щільності;
МДА	—	малоновий диальдегід;
МС	—	метаболічний синдром;
ОС	—	оксидативний стрес;
ПОЛ	—	перекисне окиснення ліпідів;
РНК	—	рибонуклеїнова кислота;
СРБ	—	С-реактивний білок;
ССЗ	—	серцево-судинні захворювання;
ТБК-АП	—	активні продукти тіобарбітурової кислоти;

ТФР- β	—	тканинний фактор росту β ;
ФНП- α	—	фактор некрозу пухлин- α
ФРЕС	—	фактор росту ендотелію судин;
ХНН	—	хронічна ниркова недостатність;
ЦД	—	цукровий діабет;

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Цукровий діабет (ЦД) на теперішній час, незважаючи на суттєві досягнення в терапії, викликає зацікавленість для багатьох науковців в зв'язку із недостатнім вивченням. Згідно прогнозам ВООЗ до 2040 року кількість осіб, що страждають на ЦД віком 20-79 років, збільшиться до 642 мільйонів [17, 20, 61, 101, 227].

Найсерйозніша небезпечність ЦД пов'язана із ускладненнями, що розвиваються при пошкоджуючій дії на судини. Важливе місце серед хронічних діабетичних ускладнень займає діабетична нефропатія (ДН) [5]. Про проблему ДН стало відомо на початку ХХ століття протягом якого вона набула драматичних масштабів та на пікові розповсюдження переступила в ХХІ століття [4, 18, 28, 225].

На сьогодні ДН є однією із провідних причин розвитку термінальної ниркової недостатності. До 70-80-х років минулого століття серед хворих на ЦД лікування гемодіалізом потребували в основному пацієнти, що страждали на ЦД 1-го типу (до 90 %) і невелика частка припадала на хворих на ЦД 2-го типу (до 10 %) [25, 135]. Сьогодні ж частка в загальній структурі діалізної терапії в світі не поступається частці хворих на ЦД 1-го типу та складає від 40 до 60 %. Враховуючи, що чисельність хворих на ЦД 2-го типу в 9-10 разів перевищує кількість хворих на ЦД 1-го типу можна зробити висновок, що масштаби «тихої» епідемії термінальної ниркової недостатності будуть перевищувати можливості діалізної служби в світі [2, 26, 55, 89, 223].

Серед етіопатогенетичних предикторів, які пов'язані із розвитком та прогресуванням ДН виділяють так звані «медіатори» пошкодження тканини нирок – вазоактивні фактори, клітинні фактори росту, кінцеві продукти глікозилювання білків та ліпідів, фактори оксидативного стресу (ОС) та антиоксидантного захисту (АОЗ), цитокіни [24, 69]. Припускають, що зазначені цитотоксичні «медіатори» за умов хронічної гіперглікемії провокують порушення міжклітинної взаємодії, зміни структури ниркової тканини та

підвищення проникності ниркових мембран. Однак, патогенез ДН повністю не з'ясований, що ускладнює інтерпретацію лабораторних досліджень та моніторинг лікування пізніх діабетичних ускладнень [21, 63, 75, 111].

Ступінь поширеності ЦД 2-го типу та його ускладнень гостро потребує подальшого пошуку додаткових методів традиційного та/або нетрадиційного лікування. Застосування засобів природного походження (зокрема, лікарських рослин) в комплексі з амінокислотами у зазначеній проблемі виступає як «новий» ад'ювантний метод [22, 88, 187].

Призначення фітозасобів та амінокислот не є альтернативою застосування інсуліну та/або синтетичних цукрознижувальних препаратів, одна така терапевтична комбінація здатна проявити суттєву підтримку стандартному способу лікування на всіх стадіях захворювання, а на ранніх етапах навіть може замінити традиційне лікування. Використання додаткової терапії біофлавоноїдів та амінокислот дозволило б знизити дозу антидіабетичних (синтетичних) засобів, нейтралізувати побічну дію деяких з них, поліпшити чутливість до інсуліну тканин-мішеней, активізувати регенераційні процеси у β -клітинах підшлункової залози, поліпшити неспецифічну загальну опірність організму тощо [22, 88, 102, 181, 187].

Окрім цього, традиційна фармакологічна терапія ЦД 2-го типу зменшує ризик діабетичних ускладнень, але вона не в змозі забезпечити довготривалу нормалізацію метаболічних порушень, саме це і може здійснювати фітотерапія у комплексі з амінокислотами.

Тому доцільним та актуальним є вивчення впливу антиоксидантної терапії біофлавоноїдами та амінокислотами на перебіг ЦД 2-го типу та мікроангіопатичних ускладнень на тлі даного захворювання.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами

Дисертаційна робота є фрагментом комплексних клініко-лабораторних досліджень, здійснених Одеським національним медичним університетом МОЗ України в межах виконання НДР «Патофізіологічні механізми ендотеліальної дисфункції та порушень системи гемостазу при метаболічному синдромі та

патогенетичне обґрунтування їх корекції», (№ державної реєстрації 0115U006687). Строк виконання: січень 2017-грудень 2021 рр.).

Фрагмент цієї роботи, присвячений виявленню ключових ланок у розвитку мікросудинних уражень на тлі ЦД 2-го типу, а також патогенетичному обґрунтуванню ефективності застосування антиоксидантної терапії в комплексі з L-аргініном в якості додаткової терапевтичної схеми .

Дисертант був співвиконавцем зазначеної теми.

Мета і завдання дослідження – патогенетично обумовити ефективність комплексної терапії L-аргініну та біофлаваноїдів (екстракту із червоного винограду) при експериментальному цукровому діабеті 2-го типу з метою запобігання діабетичних ускладнень та покращення якості життя.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі *задачі*:

1. Встановити динаміку змін фізіологічних та біохімічних показників, особливості функціональної активності нирок, а також дослідити роль показників, що характеризують ендотеліальну дисфункцію, в розвитку та прогресуванні діабетичної нефропатії на тлі цукрового діабету 2-го типу.

2. Вивчити зміни рівнів проти- і прозапальних цитокінів у розвитку діабетичної нефропатії.

3. Визначити активність ферментної системи глутатіону в еритроцитах при діабетичній нефропатії.

4. Дослідити роль АОЗ та ПОЛ у формуванні пошкоджень, що розвиваються при діабетичній нефропатії.

5. Оцінити доцільність застосування антиоксидантної терапії та L-аргініну з метою патогенетичної корекції діабетичних ускладнень.

Об'єкт дослідження – функціональні зміни ендотелію при мікроангіопатичних діабетичних ускладненнях та їх корекція комплексом біофлаваноїдів та L-аргініном.

Предмет дослідження – ендотеліальна дисфункція, про- та протизапальні цитокіни, показники антиоксидантного захисту та перекисного окиснення ліпідів в розвитку діабетичної нефропатії на тлі цукрового діабету 2-го типу.

Методи дослідження: патофізіологічні, фармакологічні, гематологічні, біохімічні та статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше в роботі використаний комплексний підхід щодо дослідження механізмів формування ЕД та її ролі в гемодинамічних і біохімічних порушеннях в нирках на тлі ЦД 2-го типу. Встановлений системний характер ОС та порушень, пов'язаних із змінами гомеостазу оксиду азоту за цих умов, патогенетичною основою яких, є ЕД. Також доведено, що однією із ключових ланок в розвитку ДН є зміна рівнів цитокінового профілю та гострофазових білків крові. Встановлено, що гіперерзистинемія асоціюється із підвищеним рівнем СРБ та фібриногену. ЦД 2-го типу є патогенетичною основою для підвищення рівня резистину та білків гострої фази. Виявлені зміни ферментативної активності еритроцитів у щурів з ДН в значній мірі обумовлені зсувами iNOS.

Практичне значення отриманих результатів. Теоретичні положення роботи використовуються в учбовому процесі на кафедрах патофізіології Буковинського державного медичного університету (м. Чернівці), Тернопільського державного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського (м. Тернопіль), Одеського національного медичного університету (м. Одеса), Харківського національного медичного університету (м. Харків), Івано-Франківського національного медичного університету (м. І.-Франківськ), Національного фармацевтичного університету (м. Харків); матеріали використовуються в науково-практичній діяльності Державного підприємства Український науково-дослідний інститут медицини транспорту МОЗ України (м. Одеса).

Результати експериментальних досліджень дозволили встановити участь порушень метаболізму оксиду азоту, показників ОС, а також прозапальних цитокінів і гострофазових білків в механізмах розвитку мікросудинних ускладнень на тлі ЦД 2-го типу; розробити новий методологічний підхід, направлений на відновлення функції ендотелію, пригнічення рівнів прозапальних цитокінів та гострофазових білків, а також врівноваження

системи АОЗ та ПОЛ, який полягає у застосуванні в якості додаткової терапії біофлавоноїдів в комплексі з L-аргініном протягом 30 діб.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто було здійснено патентно-інформаційний пошук, проведено аналіз даних літератури за темою дисертаційної роботи, визначені мета і завдання дослідження, розроблена концепція наукових досліджень, відпрацьовані адекватні дослідні моделі і методики, виконані всі експериментальні дослідження, а також проведені аналіз, систематизація і статистична обробка одержаних результатів та оформлення їх у вигляді таблиць і рисунків, сформульовані основні положення та висновки роботи. Дисертантом самостійно проведено підготовку наукових праць до публікації за основними положеннями дисертації.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень, викладені у дисертації, були представлені і обговорені на VII Пленумі Українського наукового товариства патофізіологів та науково-практичної конференції, присвячених 110-річчю з дня народження члена-кореспондента АМН СРСР, професора М. Н. Зайка «Інтегративні механізми патологічних процесів: від експериментальних досліджень до клінічної практики» (Полтава, 11-12 жовтня 2018 р.); науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 100-річчю з дня народження С. І. Корхова «Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини» (Одеса, 19-20 квітня 2018 р.); науково-практичній конференції «Патофізіологія нирок та водно-сольового гомеостазу» (Одеса, 15 – 16 лютого 2018 р.); Всеукраїнській науково-методичній конференції, присвяченій 25-річчю Медичного інституту Сумського державного університету «Перспективи розвитку медичної науки і освіти» (Суми, 16–17 листопада 2017 р.)

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 7 наукових робіт, в тому числі 1 стаття у наукометричній базі Scopus, 2 статті у фахових виданнях, рекомендованих ДАК України, 1 стаття у закордонному науковому періодичному виданні (Польща), 4 тез в матеріалах конференцій, конгресів і з'їздів.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 164 сторінках машинописного тексту, містить 12 таблиць, 32 рисунків. Робота складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, чотирьох розділів власних експериментальних досліджень, розділу аналізу та узагальнення результатів, висновків. Список літератури містить 227 посилань 97 посилань на вітчизняні джерела і 130 посилань на іноземних авторів.

РОЗДІЛ 1

ПІЗНІ МІКРОСУДИННІ УСКЛАДНЕННЯ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ: ЕПІДЕМІОЛОГІЧНІ ТА ПАТОГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ (Огляд літератури)

1.1. Сучасні уявлення про патогенез хронічних ускладнень на тлі цукрового діабету 2-го типу

ЦД у всьому світі визнаний одним із найсерйозніших неінфекційних захворювань. Він займає четверте місце серед причин смертності в розвинених країнах. Кількість хворих на ЦД постійно збільшується у зв'язку із зростанням чисельності і віку населення, урбанізації, зростання поширеності ожиріння і малорухливого способу життя [15, 20, 45, 145].

За останніми даними Міжнародної діабетичної федерації (The International Diabetes Federation), число хворих на ЦД серед дорослого населення (20-79 років) в світі до 2030 р. буде складати 439 млн. осіб [17, 49].

Незважаючи на різноманіття форм ЦД, основну частку хворих складають особи з ЦД 2-го типу, в різних популяціях та етнічних групах їх кількість досягає 80-95 %. За даними IDF, поширеність ЦД серед дорослих (20-79 років) в середньому становить 5,1 % (з них 90 % припадає на частку ЦД 2-го типу). Зокрема, у країнах Північної Америки цей показник відповідає 7,9 %, в Європейському регіоні середня поширеність ЦД становить 7,8 %, у Західно-Тихоокеанському регіоні середня поширеність ЦД складає 3,1 %. Протягом останніх двох десятиліть за умов зростання числа хворих на ЦД 2-го типу проблемою залишається його пізнє діагностування. За даними літератури, частка недіагностованого ЦД складає 29-32 % від загальної поширеності діабету. Як правило, ЦД 2-го розвивається поступово у осіб старше 35-40 років. Однак в останні десятиліття відмічається тенденція до підвищення поширеності ЦД 2-го типу у осіб молодше 30 років [20, 49, 142, 153, 214].

Якість життя хворих на ЦД в даний час визначається розвитком і прогресуванням ускладнень цього захворювання. Ризик розвитку сліпоти і хронічної ниркової недостатності (ХНН) у хворих на ЦД в 20 і 25 разів вище порівняно з особами без діабету [177]. Залежно від розмірів уражених судин виділяють мікросудинні (ураження судин дрібного калібру - капілярів, артеріол і венул) і макросудинні ускладнення (ураження судин середнього і великого калібру) [199]. На відміну від макроангіопатичних ускладнень мікросудинні розвиваються лише при ЦД і мають специфічну клінічну і морфологічну картину [50, 51, 123, 173, 179].

Згідно сучасним уявленням щодо патогенезу ускладнень ЦД 2-го типу, окрім гіперглікемії, інсулінової резистентності та гіперінсулінемії, беруть участь додаткові групи факторів ризику (рис. 1.1).



Рис. 1.1. Патогенез судинних ускладнень на тлі ЦД 2-го типу

Як і основне захворювання, судинні ускладнення ЦД є клінічно гетерогенними та етіологічно мультифакторіальними. В їх етіопатогенезі

здіянні порушення мікроциркуляції, ліпідного обміну, системи зсідання та фібринолізу, іонного та кислотно-лужного гомеостазу, обміну білкових компонентів судинної стінки та проникності судин. Тобто, «коренем» всіх діабетичних мікро- та макроангіопатій та найбільш раннім їх проявом є зміни роботи клітин ендотелію судин – ендотеліальна дисфункція (ЕД) [140]. Окрім цього, не менш важливе значення в розвитку ЦД належить ОС (рис. 1.2) [21, 134, 139, 159].

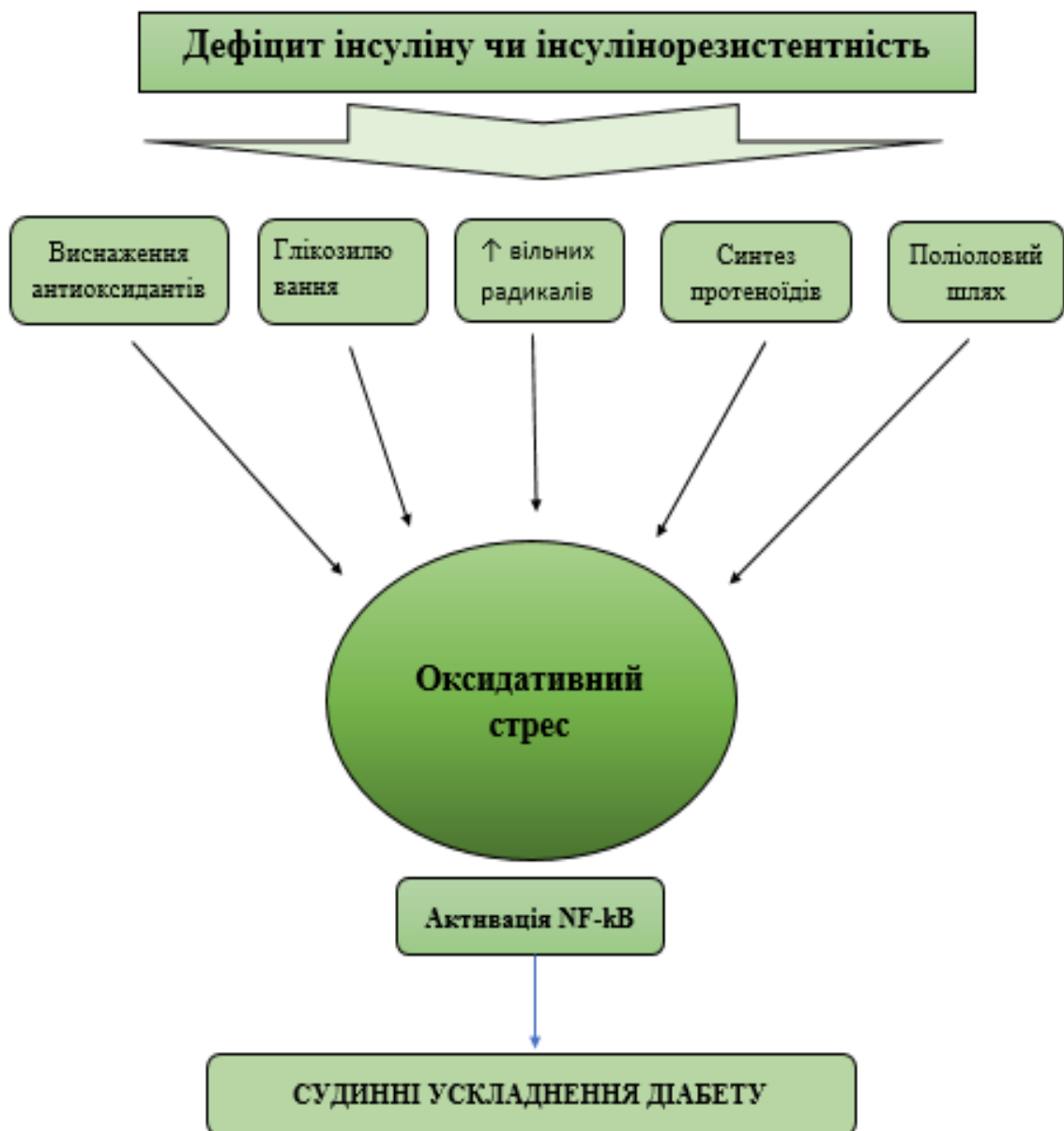


Рис. 1.2. Оксидативний стрес – одна із ключових ланок в розвитку ЦД

Ендотеліальні клітини, що вистилають русло всіх кровоносних судин тіла, забезпечують регуляцію судинного тону (зміна просвіту судин за рахунок скорочення або розслаблення клітин гладкої мускулатури) і, відповідно, регуляцію артеріального тиску (АТ), перерозподіл кровотоку, постачання тканин і органів киснем і продуктами метаболізму в залежності від їх потреб. Ендотелій бере активну участь у багатьох локальних і системних метаболічних процесах, у регуляції гемостазу, проліферації і міграції клітин різних типів, в забезпеченні цілісності судинної стінки, її проникності, у відновленні пошкоджених судин і неоваскуляризації тканин при ішемії. Ці функції ендотелію реалізуються через різні механізми, в першу чергу за допомогою факторів, які синтезуються власне ендотелієм (судинозвужувальних і ростових факторів, факторів зсідання крові та компонентів фібринолітичної системи), що дозволяє віднести ендотелій до паракринних органів. Зміни (зазвичай підвищення) концентрації багатьох з цих чинників в крові хворих на ЦД прийнято вважати маркерами ушкодження ендотелію [78, 83, 93, 103, 112, 126].

Порушення метаболізму при ЦД можуть призвести не лише до функціональних порушень в клітинах ендотелію судин. З часом вони викликають серйозні структурні зміни як в дрібних, так і в великих судинах. В першому випадку – це потовщення базальної мембрани, порушення її вибіркової проникності, проліферація клітин гладкої мускулатури судин, а у другому – також звуження просвіту судин, але за рахунок атеросклеротичних змін їх стінки. У розвитку структурно-функціональних аномалій, що лежать в основі діабетичних ангіопатій та асоційованих з ними патологій (порушення зсідання крові, артеріальної гіпертензії), бере участь велика кількість взаємодіючих між собою процесів [75, 84, 96, 97, 114].

Однією із ключових ланок в механізмі розвитку хронічних діабетичних ускладнень є тривалий і неконтрольований при ЦД вплив глюкози на різні структури клітин, тканин і органів (глюкозотоксичність). Існує декілька шляхів реалізації феномена глюкозотоксичності. Найважливішими з них є наступні:

а) неферментативне глікозилювання білків і інших сполук, що містять вільні аміногрупи; б) пов'язане з неферментативним глікозилюванням аутоокиснення (більш відоме, як перекисне окиснення) глюкози, а також ліпідів і білків, що супроводжується підвищенням рівня вільних радикалів. Крім того, стан гіперглікемії призводить до того, що окремі ланки системи АОЗ організму не справляються із підвищеним навантаженням. Порушення балансу окисно-відновних процесів і посилення неконтрольованих вільнорадикальних реакцій називають ОС, який проявляє безпосередньо негативний вплив на ендотелій судин та нейрони. Іще одним механізмом глюкозотоксичності є активація поліолового (сорбітолового) шляху обміну глюкози [151, 196, 197, 206] (рис. 1.3).

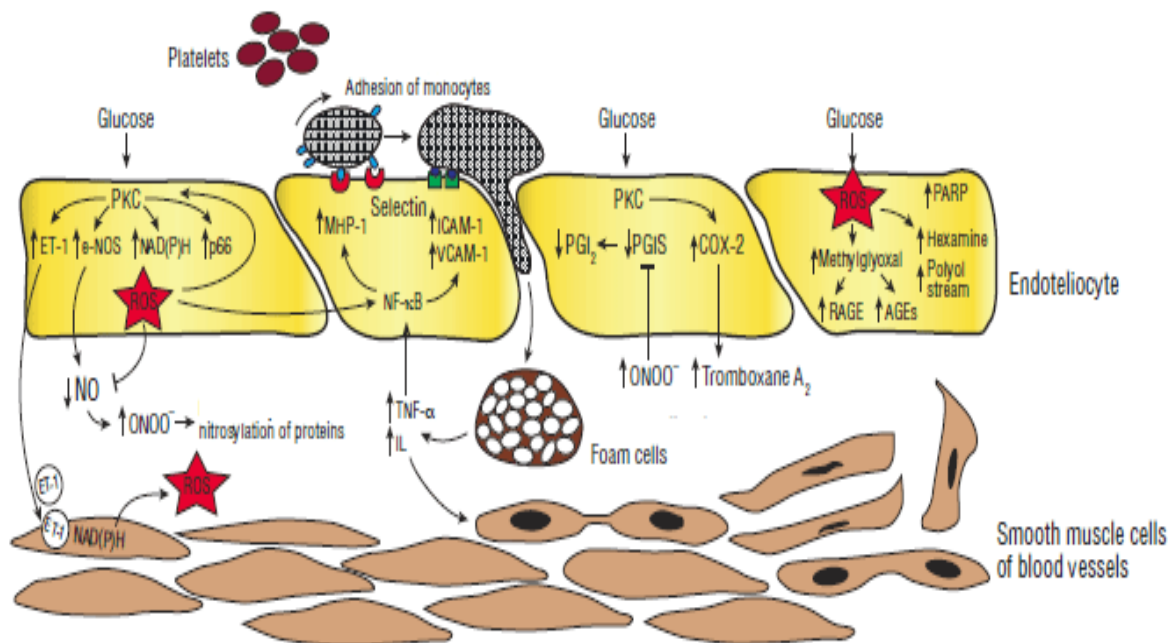


Рис. 1.3. Наслідки гіперглікемії: пошкодження ендотелію, активація запальних процесів, порушення в системі тромбоцитарного гемостазу, а також дисбаланс системи, що контролює ангіогенез

Отже, хронічна гіперглікемія проявляє пряму шкідливу дію і може безпосередньо приводити до структурних змін різних компонентів клітинних мембран ендотелію судин і міжклітинної речовини (глікозилювання, перекисне

окислення білків і ліпідів). Оскільки клітини судинного ендотелію є не залежними від інсуліну споживачами глюкози, при гіперглікемії різко зростає і внутрішньоклітинний вміст цього моносахарида, тому клітини ендотелію стають одними із мішеней глюкозотоксичності. Окрім безпосереднього пошкоджуючого впливу на різні структури організму, глюкоза може впливати на метаболізм клітин і тканин за рахунок експресії різних генів, в тому числі і тих, білкові продукти яких беруть участь в розвитку судинної патології при ЦД. Так, підвищення концентрації глюкози призводить до посилення біосинтезу таких компонентів базальної мембрани ендотеліальних клітин, як фібронектин, колаген IV і ламінін, що, ймовірно, і обумовлює її потовщення – важлива патоморфологічна ознака зміни судинної стінки при ЦД. Збільшення маси міжклітинного матриксу в ниркових клубочках і потовщення базальної мембрани ендотелію відбувається не тільки за рахунок стимуляції біосинтезу білків, але і внаслідок зниження їх деградації при підвищеному вмісті глюкози. Концентрація глюкози може, ймовірно, також регулювати рівень експресії генів глюкозного транспортера і ферменту альдозоредуктази в клітинах ендотелію мікро- і макросудин та в перипіцитах сітківки ока. Ці дані ще раз підкреслюють, що в розвитку судинної патології при ЦД метаболічні і генетичні фактори можуть тісно взаємодіяти, проявляючи як синергічний, так і антагоністичний ефект [35, 56, 61, 73, 105, 148, 166].

1.2. Діабетична нефропатія: епідеміологічні аспекти, патогенез і фактори ризику

ДН, яка проявляється альбумінурією, АГ і прогресивним зниженням швидкості клубочкової фільтрації розвивається у 10-40 % пацієнтів, що страждають на ЦД. У 30-40 % пацієнтів, які потребують нирковозамісної терапії, ниркова недостатність є наслідком ДН, поширеність якої продовжує наростати [5, 113, 150, 178].

Факторами ризику ДН виступають: генетична схильність, АГ,

гіперглікемія, гіперфільтрація, куріння, літній вік, чоловіча стать, переважання в раціоні продуктів з високим вмістом білка тощо [16, 147, 184, 189, 194, 198, 210, 212].

Специфічне ураження нирок при ЦД, що супроводжується формуванням вузликового гломерулосклерозу, приводить до розвитку термінальної ниркової недостатності та вимагає проведення замісної ниркової терапії (діаліз, трансплантація). Це ускладнення діабету розвивається з однаковою частотою у хворих ЦД 1-го типу та 2-го типу – 40-45 %. Частота виявлення ДН знаходиться в прямій залежності від тривалості діабету [24, 25, 121, 216].

ДН характеризується такими проявами, як протеїнурія, АГ та прогресуюча ниркова недостатність. Також можливий розвиток анемії, електролітних та мінеральних розладів. При ДН нефротичний синдром має наступні особливості: масивні набряки можуть розвиватися навіть при незначній гіпоальбумінурії; набряковий синдром при ЦД резистентний до терапії сечогінними препаратами; висока протеїнурія може зберігатися і при розвитку хронічної ниркової недостатності [6, 50, 86, 87, 120, 221, 223, 225].

1. Порушення вуглеводного обміну

В даний час доведена пряма залежність темпів розвитку ДН від рівня порушень вуглеводного обміну у хворих, що страждають на ЦД 1-го типу. Гіперглікемія обумовлює шкідливу дію на судини клубочків як прямо, так і опосередковано через активацію деяких біохімічних процесів. Пряма глюкотоксичність пов'язана, зокрема, з тим, що висока концентрація глюкози може пошкоджувати ендотелій судин. Відомо, що ендотеліальні клітини є інсуліннезалежними, тому за умов гіперглікемії глюкоза безперешкодно проникає в них, викликаючи порушення їх функції в результаті патологічних метаболічних зсувів. Високі концентрації глюкози порушують експресію генів, відповідальних за синтез протеогліканів в культурі ендотеліальних клітин [7, 14, 43].

Одним із найважливіших механізмів патогенної дії високої концентрації глюкози є неферментне глікозилювання білків (реакція між глюкозою і

амінокислотними залишками структурних і циркулюючих білків, яка не вимагає наявності специфічних ферментів). Накопичення як оборотних, так і (особливо) кінцевих продуктів глікозилювання пошкоджує структуру нирок, яка сприяє підтримці гіперфільтрації. Глікозилювання структурних білків мезангія і базальної мембрани (БМ) клубочків призводить до порушення синтезу їх основних компонентів, зниження селективності БМ, порушення її інфраструктури та потовщення; одночасно з порушенням структури і функцій БМ гіперглікемія ініціює експансію клітин мезангію [9, 13, 90].

У патогенезі порушення функції інсуліннезалежних тканин велике значення має перетворення глюкози за поліоловим шляхом в сорбітол під впливом ферменту альдозоредуктази. Накопичення надмірної кількості сорбітолу в клітинах підвищує осмотичний тиск і викликає клітинний набряк, створюючи умови для порушення функції клітин і сприяючи порушенню мікроциркуляції. Утворення внутрішньоклітинного сорбітолу відбувається переважно в клітинах ендотелію судин, ниркових клубочків, нервових волокон, кришталика, а також в перицитах сітківки [53, 146, 171, 172].

2. Гіперліпідемія

Патогенетична роль порушень ліпідного обміну в прогресуванні ураження нирок при ЦД почала обговорюватися тільки в останні роки. Відомо, що як при ЦД 1-го типу, так і при ЦД 2-го типу відзначається підвищення вмісту в крові загального холестерину, тригліцеридів і особливо холестерину ліпопротеїнів низької (ЛПНЩ) та дуже низької щільності. При цьому гіперліпідемія при ЦД може бути пов'язана з декомпенсацією ЦД, що супроводжується порушенням активності ліпопротеїнліпази, а також може бути обумовлена первинними порушеннями ліпідного обміну. Останнім часом доведено, що разом з гіперглікемією гіперліпідемія може відігравати роль самостійного патогенетичного фактору, що індукує розвиток ДН. Наприклад, гіперхолестеринемія у хворих, що страждають на ЦД 1-го типу є важливим прогностичним фактором ризику розвитку у них ДН. Це підтверджується і тим,

що досягнення нормалізації вмісту холестерину в крові здатне уповільнити прогресування ДН, однак механізми впливу гіперліпідемії на розвиток ДН на сьогодні маловивчені. На думку дослідників, гіперліпідемія призводить до пошкодження ендотеліальних клітин клубочків і відкладення ліпідів в мезангії, його експансії, надмірному утворенню екстрацелюлярного матриксу і в кінцевому підсумку до гломерулосклерозу. Ряд досліджень, проведених на лабораторних тваринах, показує, що гіперліпідемія, викликана гіперхолестериною дієтою або обумовлена генетично, здатна індукувати розвиток гломерулосклерозу, а її корекція препаратами, що нормалізують ліпідний склад крові, уповільнює або запобігає цим змінам [19, 99, 194].

Морфологічно зміни в нирках у тварин з індукованим ЦД характеризуються розвитком фокально-сегментарного гломерулосклерозу із розширенням мезангія через відкладення мембраноподібного матеріалу, проліферацією мезангіальних клітин, що мають ліпідні включення, і великою кількістю пінистих клітин (макрофаги, що містять велику кількість ліпідів) [62, 91, 195].

Механізм проникнення ліпідів в ниркову тканину вивчений недостатньо, проте, ймовірно, він пов'язаний з підвищеною проникністю деформованої БМ клубочків у хворих з ДН. Що ж стосується причин появи ліпідних включень в нирковій тканині у хворих з ще не пошкодженим клубочковим фільтром при відсутності клінічних ознак ураження нирок і навіть гіперліпідемії, то, очевидно, в основі цього складного процесу лежить внутрішньоклубочкова гіпертензія. Характерно, що в нирках щурів з індукованим діабетом поява ліпідних відкладень обумовлена внутрішньоклубочковою гіпертензією, причому навіть при відсутності гіперхолестеринемії. Ліпіди, накопичуючись в ниркових структурах, призводять до порушення їх функції, викликають проліферацію мезангіальних клітин і надлишкову продукцію ними позаклітинного матриксу, що призводить до розвитку гломерулосклерозу [200, 213].

3. Гемодинамічні порушення

За сучасними уявленнями послідовність формування гемодинамічних розладів при ДН характеризується наступною періодичністю. Гіперглікемія, ймовірно, є пусковим фактором у розвитку порушень внутрішньониркової гемодинаміки, що проявляються внутрішньоклубочковою гіпертензією, гіперфільтрацією і гіперперфузією нирок, а на більш пізніх стадіях ДН приєднується і системна АГ, яка в свою чергу прискорює розвиток склеротичних змін в нирковій тканині [10, 13, 39].

У ряді досліджень, присвячених патогенезу ДН, переконливо доведено, що в основі її виникнення та прогресування лежить внутрішньоклубочкова гіпертензія. Так, в дослідженнях на тваринах з індукованим ЦД з використанням мікропункційної техніки було показано збільшення градієнта внутрішньоклубочкового тиску на тлі гіперглікемії, а застосування препаратів, що знижують підвищену внутрішньоклубочкову гіпертензію, запобігало розвитку діабетичної гломерулопатії. У хворих на ЦД про розвиток внутрішньоклубочкової гіпертензії свідчить підвищення показників клубочкової фільтрації, які часто виникають задовго до появи клінічних ознак ураження нирок. У дослідженнях показано, що внутрішньоклубочкова гіпертензія, яка оцінюється на підставі визначення функціонального ниркового резерву, розвивається вже на самих ранніх стадіях і може індукувати розвиток і прогресування нефропатії незалежно від ступеня метаболічного контролю і вираженості АГ [39, 40, 44, 59].

Провідним патогенетичним фактором розвитку стійкого підвищення внутрішньоклубочкового тиску при ЦД більшість дослідників вважають порушення регуляції тонусу аферентних і еферентних артеріол клубочків. Встановлено, що вже на ранніх стадіях ЦД аферентна артеріола розширюється і втрачає здатність до ауторегуляції тонусу, в той час як тонус еферентної артеріоли не змінюється. Цей дисбаланс може посилюватися підвищеною чутливістю еферентних артеріол до впливу катехоламінів і ангіотезину II.

Внаслідок такого дисбалансу виникає підвищення градієнта гідростатичного тиску в капілярах клубочків, що призводить до гіперперфузії і гіперфільтрації.

Крім цього, є докази того, що важливу роль у розвитку гіперфільтрації може відігравати підвищений рівень глюкози, кетонових тіл, гормону росту.

Отже, роль внутрішньоклубочкової гіпертензії в розвитку ДН доведена, однак більш детальні механізми структурних і функціональних порушень нефрону вимагають подальшого вивчення. Ймовірно, внутрішньоклубочкова гіпертензія порушує структуру і проникність БМ, в результаті чого білки, ліпіди та інші компоненти плазми проникають через неї і відкладаються в мезангії, що тягне за собою його експансію, гіперпродукцію матриксу, а потім і склероз, що в кінцевому результаті призводить до розвитку характерного для ЦД синдрому. З іншого боку, має місце припущення що механічне подразнення структурних компонентів клубочка внаслідок підвищеного гідростатичного тиску сприяє зростанню об'єму мезангіального матриксу і гіперпродукції мезангіальними, ендотеліальними і епітеліальними клітинами речовини, за біохімічним складом близької до субстанції БМ клубочків [217].

На більш пізніх стадіях розвитку ДН відзначається, як правило, приєднання системної АГ. При цьому у хворих на ЦД 1-го типу причиною підвищення АТ є ДН, тоді як при ЦД 2-го типу частіше має місце есенціальна гіпертензія, яка з'являється ще до розвитку ниркової патології. Гіпертонія, що розвивається при ДН, є низькореніноюю і об'ємозалежною, тобто вона розвивається внаслідок первинної затримки натрію і води нирками при нормальних або навіть знижених показниках активності ренін-ангіотензинової системи. Крім того, в дослідженнях встановлено різке підвищення чутливості судин до катехоламінів і ангіотензину II у хворих на ЦД, що також сприяє підвищенню системного АТ [209].

Показано, що існує позитивна кореляція між рівнем АТ, з одного боку, і наростанням протеїнурії, швидкістю зниження клубочкової фільтрації і виразністю гломерулосклерозу, а досягнення стійкої нормалізації АТ призводить до зниження протеїнурії і сповільнення зниження швидкості

клубочкової фільтрації. Ймовірно, за умов порушення ауторегуляції тонуусу артеріол клубочків і розширення приносних артеріол при нормальному або частіше підвищеному тонуусі звужених виносних артеріол підвищений системний АТ може прямо і негативно впливати на судини клубочка, збільшуючи внутрішньоклубочкову гіпертензію і сприяючи прогресуванню ДН [127, 128].

4. Порушення гемостазу

Велике значення в патогенезі діабетичних ангіопатій і ураження нирок, зокрема, приділяється порушенням системи гемостазу. Характерні для хворих на ЦД підвищення рівнів факторів коагуляції в плазмі, зміни активності антикоагуляційної системи і зниження фібринолітичної активності, а також гіперактивність тромбоцитів свідчать про наявність у них стану гіперкоагуляції, що призводить до порушення мікроциркуляції і розвитку судинних ускладнень.

Численні дослідження, присвячені вивченню розладів тромбоцитарного ланки гемостазу при ЦД, свідчать про виражену активацію тромбоцитів як *in vivo*, так і *in vitro*, причому в ряді випадків навіть при відсутності ангіопатій зміна функції тромбоцитів передуює розвитку судинних ускладнень. Однак гіперактивність тромбоцитів більш виражена при наявності діабетичних ангіопатій. Маркерами підвищеної функціональної активності тромбоцитів є збільшення рівня тромбоцитарного фактора 4, β -тромбоглобуліна і синтезу тромбоксану A₂, а також вираженість спонтанної і індукованої агрегації тромбоцитів *in vitro*. Доведено, що у хворих на ЦД 1-го типу з альбумінурією і протеїнурією відзначаються більш високі рівні β -тромбоглобуліна і тромбоцитарного фактора 4 порівняно з хворими, у яких була відсутня підвищена екскреція білка з сечею. Важливими для розуміння причинами активації тромбоцитів при ЦД є дані про те, що існує зв'язок між порушеннями ліпідного обміну і змінами тромбоцитарної ланки гемостазу. В даному дослідженні показано, що у хворих на ЦД з альбумінурією є чітка кореляція між рівнем ЛПНЩ і холестерину, з одного боку, і вмістом тромбоксану B₂ (стійкого метаболіту тромбоксану A₂) і β -тромбоглобуліна, з іншого. Ймовірно,

взаємодія надлишкової кількості ЛПНЩ, особливо їх окисненої форми, з мембраною тромбоцита призводить до його активації. У той же час при ЦД відзначено зниження продукції судинним ендотелієм простацикліну, що також призводить до гіперагрегації. Однак механізм активації тромбоцитів при ЦД вивчений недостатньо [124, 125, 136, 169, 174].

Для ЦД характерним є також порушення плазмової ланки гемостазу і гемостатичних функцій судинного ендотелію. Багато дослідників відзначають підвищення вмісту в плазмі крові фактора Віллебранда в комплексі з фактором VIII, який синтезується ендотелієм. Рівень фактора Віллебранда був підвищений у хворих на ЦД з ураженням нирок, а також у хворих з ДН, яка розвинулася протягом 3 років після обстеження. При ЦД також відзначається зміна вмісту в плазмі і інших чинників коагуляції. При цьому активація внутрішнього шляху зсідання може бути викликана стимуляцією тромбоцитами факторів коагуляції, а тканинний тромбопластин з пошкодженої судинної стінки може викликати гіперкоагуляцію за зовнішнім шляхом. При ЦД спостерігається підвищення факторів V, IX, XII та VII. Ці зміни поєднуються зі зниженням в крові хворих на ЦД активності одного з найважливіших регуляторів гемостазу – антитромбіну-III, безпосередньо індукованим гіперглікемією, що також призводить до гіперкоагуляції і порушення мікроциркуляції [85, 122, 168, 190].

5. *Порушення функції базальної мембрани клубочків та ендотеліальних клітин*

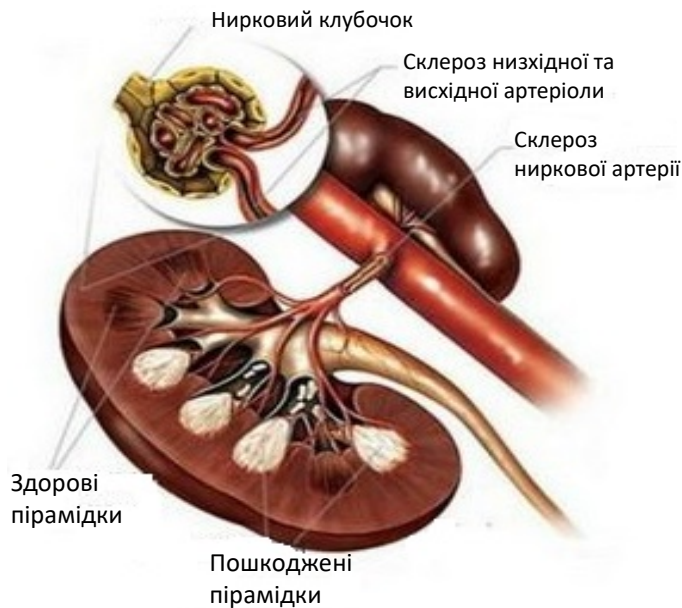


Рис. 1.4. Розвиток ДН

В останні роки все більшу увагу дослідників привертає значення зміненого стану ендотелію ниркових судин у розвитку ДН. Ендотелій клубочкової капілярів є першим шаром клітин на шляху ультрафільтрації, що визначає виняткову важливість його стану; він постійно піддається дії різноманітних гемодинамічних і метаболічних факторів, таких як

порушення вуглеводного і ліпідного обміну, системної і клубочкової гіпертензії (рис. 1.4). Ендотелій надзвичайно чутливий до гіперглікемії, так як ендотеліальні клітини є інсулінонезалежними і глюкоза безперешкодно проникає в них, викликаючи патологічні біохімічні реакції. Всі ці фактори призводять до порушення функції ендотелію, що сприяє розвитку нефропатії. В ряді досліджень були отримані дані про те, що ендотелій є джерелом біосинтезу тканинного ангіотензину II, а також простацикліну і брадикініну. Крім того, в ендотеліальних клітинах продукуються ще більш потужні регулятори судинного тону – вазоконстриктор ендотелін-1, чутливість ниркових судин до якого в 10 разів вище, ніж судин інших органів, і ендотеліальний фактор релаксації (вільно-радикальні форми оксиду азоту), що врівноважують дію один одного у здорових людей. Однак при ЦД нормальне співвідношення між речовинами, що виявляють судинозвужувальну і судинорозширювальну дію, порушується. В дослідженнях продемонстровано збільшення активності синтезу ендотеліального фактора релаксації у щурів з індукованим діабетом, що призводить до зниження тону приносних артеріол і підвищення швидкості клубочкової фільтрації і внутрішньоклубочкового гідростатичного

тиску. Ці результати були підтверджені і в клінічних дослідженнях: показано збільшення синтезу ендотеліального фактора релаксації у хворих на ЦД 1-го типу з ДН, причому максимальна активність відзначалася у хворих з гіперфільтрацією. У той же час продемонстровано підвищення рівня ендотеліну-1 в плазмі хворих з ЦД 1-го типу з мікроальбінурією, надлишок якого призводить до спазму артерій клубочків, переважно еферентних, що викликає підвищення внутрішньоклубочкового гідростатичного тиску, але не супроводжується підвищенням фільтрації, так як одночасно знижується коефіцієнт ультрафільтрації (через скорочення мезангіальних клітин). Крім того, ендотелій продукує фактор Віллебранда, а також тканинний активатор плазміногену і його інгібітор. Порушення синтезу зазначених біологічно активних речовин, а також гіперпродукція ендотелієм різних факторів росту сприяють прогресуванню ДН. В експерименті з культурою тканини ендотеліальних клітин показано, що в умовах гіперглікемії вони продукують надмірну кількість глікопротеїнів, що входять до складу БМ та призводить до її потовщення. У нормі до складу БМ входить колаген (переважно IV і V типу) і глікозаміноглікани: гепарансульфат, дерматансульфат, хондроїтинсульфат, а також фібронектин. Гепарансульфат – негативно заряджений завдяки наявності сульфогрупи глікозаміноглікану, що відіграє найважливішу роль в підтримці зарядоселективності стінки ниркових капілярів по відношенню до негативно заряджених білків плазми, перш за все до альбуміну. Крім цього, гепарансульфат бере участь в регуляції проліферації мезангіальних клітин і утворенні позаклітинного матриксу. При ЦД відзначається різке зниження вмісту гепарансульфату в БМ клубочка, в результаті чого мембрана втрачає свої зарядоселективні властивості і стає проникною для негативно заряджених молекул, що проявляється появою і наростанням альбумінурії. Цей факт встановлений і підтверджений численними дослідженнями як на тварин, так і на хворих на ЦД, проте механізм залишається недостатньо вивчений [30, 57, 65, 91, 95, 110, 137, 149, 152, 167, 185]

1.2.1. Дисфункція ендотелію та діабетична нефропатія

ЕД – це втрата ендотелієм здатності здійснювати нормальні біологічні процеси. ЕД є маркером судинних захворювань і часто призводить до атеросклерозу. Ключовою ланкою формування ЕД вважають зниження рівня біологічно активного NO (оксиду азоту), що виділяється судинним ендотелієм, або зниження його біодоступності [12, 23, 48, 71, 191]

ЕД розвивається в присутності факторів ризику ССЗ, пов'язаних з атеросклерозом. Це порушення виявляють у хронічних курців, осіб з підвищеним рівнем холестерину ЛПНЩ, хворих на ЦД 1-го типу та ЦД 2-го типу, осіб, які страждають на АГ і пацієнтів з метаболічним синдромом (МС). Наявність факторів ризику синергічно погіршує функцію судинного ендотелію.

Мікросудинні ускладнення (ретинопатія, нефропатія та нейроангіопатія) характерні для ЦД 2-го типу, в клініці і експерименті реалізовані шляхом розвитку і прогресування ЕД. Експериментальні дослідження на щурах зі стрептозотоциновим ЦД підтвердили дані щодо гіперпродукції NO на ранніх стадіях ЦД і його ролі в розвитку діабетичної нефропатії, яка може бути обумовлена iNOS і надавати не регуляторний, а цитостатичний і цитотоксичний ефекти (рис. 1.5) [23, 170, 192].

ЦД характеризується рядом метаболічних розладів, включаючи гіперглікемію, дисліпідемію, абдомінальне ожиріння та інсулінорезистентність, які пов'язані з порушенням функції ендотелію судин, що робить їх схильними до атеросклерозу. Всі ці метаболічні порушення супроводжуються підвищеною продукцією вільних жирних кислот та інсулінорезистентністю, які знижують біодоступність NO [154, 186].

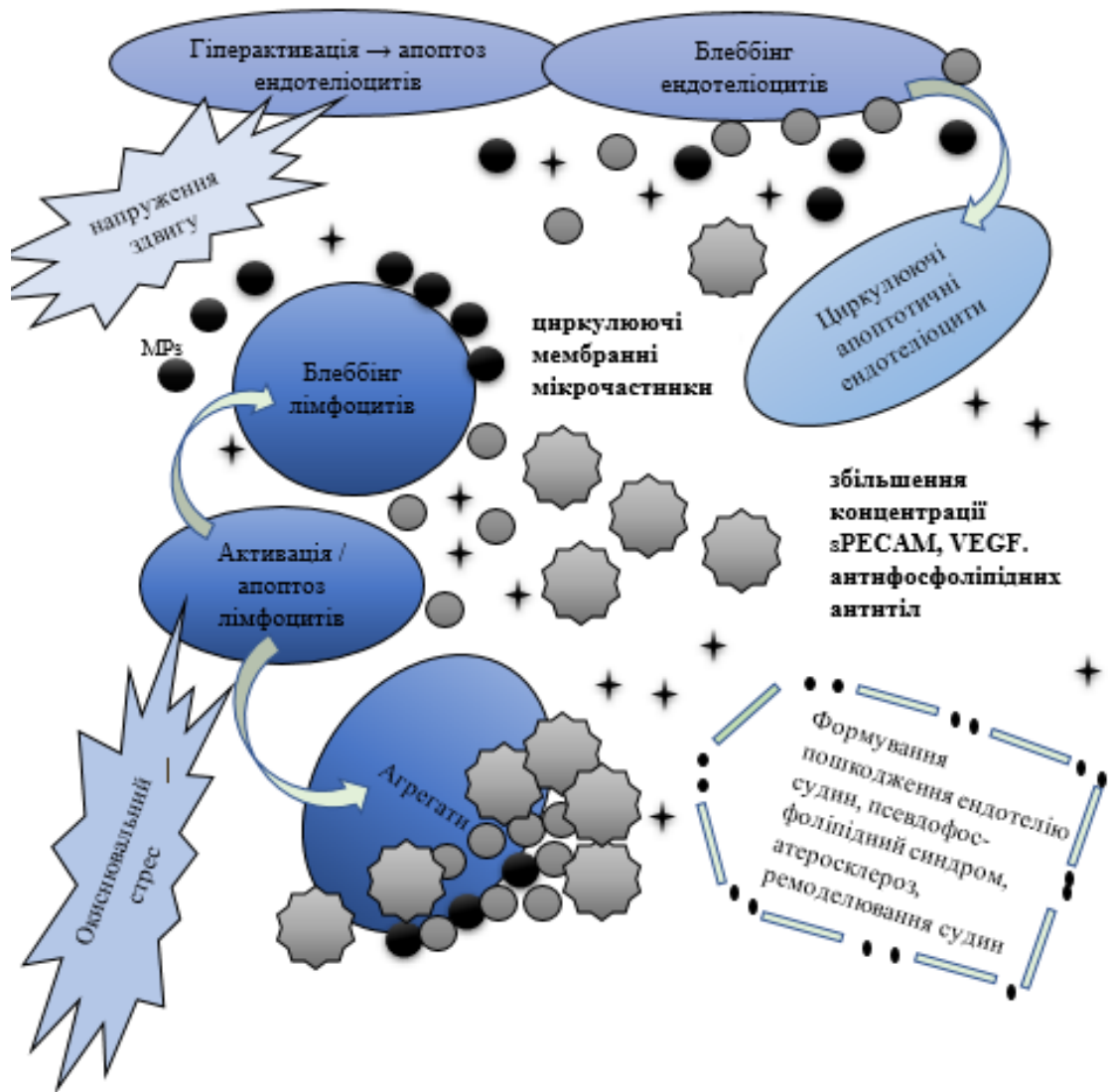


Рис. 1.5. Формування ендотеліальної дисфункції при діабетичній нефропатії [12, 23, 48, 191]

Оскільки інсулін регулює активність eNOS за рахунок фосфорилування протеїн кінази В – важливої сигнальної молекули на шляху передачі інсулінового сигналу, інсулінорезистентність є одним з основних факторів, що асоціюються з ЕД при ожиріння та ЦД. При гіперглікемії активуються протеїнкіназа С, ОС і метаболізм гексозамінів тощо. Тобто мають місце саме ті порушення, які індукують ослаблення активності eNOS [129, 188, 193, 203].

При гіперглікемії знижується продукція NO за участю eNOS і посилюється її деградація за рахунок генерації активних форм кисню (АФК). Продукція АФК при гіперглікемії обумовлена їх впливом, як на ферментативні,

так і неферментативні джерела ОС: протеїнкіназу та НАДФН-оксидазу, з одного боку, і утворення кінцевих продуктів глікозилювання (КПГ), з іншого. Фермент протеїнкіназа С виконує найважливіші функції фосфорилювання білків і регулює велику кількість метаболічних процесів. При посиленні ОС один з кофакторів eNOS, окиснюється, що призводить до роз'єднання eNOS (замість NO фермент продукує супероксид-аніон) [138, 162, 202].

Інсулінорезистентність при ЦД розвивається в ряді тканин-мішеней, включаючи судинний ендотелій. Інтактний ендотелій, що забезпечує передачу сигналу між клітинами, необхідний для нормального функціонування судин. У досліджах у генетично модифікованих мишей, які не мають рецептора до інсуліну на ендотеліальних клітинах, рівень eNOS був знижений на 60 % порівняно з контролем. Дійсно, при інсулінорезистентності ендотелію змінюється характер активації внутрішньоклітинних сигнальних шляхів з переважанням стимуляції мітогенактивованих протеїнкіназ і зниженням фосфатидилинозитол-3-кінази, що пов'язане зі зниженням продукції NO, підвищенням синтезу ендотеліну-1, посиленням транскрипції генів, що кодують прозапальні білки, і гіперкоагуляцією. В підтвердження є дані про те, що поліпшення чутливості ендотелію до інсуліну на тлі терапії супроводжується збільшенням біодоступності NO [129, 141, 160].

Гіперглікемія за умов інсулінової недостатності призводить також до утворення глікозильованого гемоглобіну і вторинної гемічної тканинної гіпоксії. Вміст різних фракцій гемоглобіну при ЦД свідчить про те, що на тлі зниження парціального тиску кисню в крові, збільшується процентний вміст фракцій гемоглобіну, в яких заблокована киснево-транспортна функція. За таких умов кисень, необхідний організму для функціонування мітохондріального ланцюга перенесення електронів, стає токсичною речовиною. З'являються системні метаболічні розлади, характер і спрямованість яких дозволяє припускати, що одним з механізмів їх виникнення є підвищення інтенсивності вільно-радикального окиснення мембранних фосфоліпідів, який приводить до накопичення токсичних продуктів, окисної

деструкції ліпідів, порушення функціональної здатності мембранних структур і відповідної зміни клітинного метаболізму [131, 132, 143, 165].

Ще одним процесом, характерним для ЦД, є неферментативне глікозилювання макромолекул, коли за умов гіперглікемії і ОС модифікуються багато білків і навіть ліпідів (фосфоліпідів) з утворенням і накопиченням так званих КППГ. Показано, що підвищене утворення КППГ асоціюється зі зниженою біодоступністю NO та обумовлено порушенням транскрипції eNOS, зниженням її активності і посиленою продукцією АФК [131, 205].

1.2.2. Концепція системного та локального запалення в розвитку діабетичної нефропатії

Сьогодні активно вивчаються різні аспекти пошкоджуючої дії на нирки прозапальних цитокінів: фактора некрозу пухлин (ФНП- α), інтерлейкіну-1, інтерлейкіну-6 та інтерлейкіну-18 (табл. 1.1).

Ряд експериментальних та клінічних досліджень свідчить про те, що інсулін пригнічує синтез реактивних форм кисню, прозапальних цитокінів та металопротеїназ лейкоцитами, що дозволяє припустити наявність прямого зв'язку між інсулінорезистентністю та запаленням. Ключовим моментом в розвитку ДН є розвиток інсулінорезистентності подоцитів: порушення чутливості цих клітин до інсуліну призводить до зміни роботи їх цитоскелету, проявів протеїнурії та характерних для ДН структурних перебудов за умов нормоглікемії. Механізми розвитку інсулінорезистентності подоцитів при ЦД на сьогодні залишаються не повністю з'ясовані, однак одним із можливих пояснень є зв'язок із запаленням [33, 34, 41, 66, 100, 107, 144, 201].

Джерелами цих сполук, згідно сучасних уявлень, можуть бути не лише різні види лейкоцитів, але і клітини інших типів (адипоцити, подоцити, ендотеліальні, каналцеві, епітеліальні, мезангіальні клітини тощо). Гіперпродукція прозапальних цитокінів при ЦД обумовлена широким колом взаємопов'язаних причин, в тому числі накопичення в організмі кінцевих продуктів глікозилювання, ЕД, дисліпідемією, ОС та ожирінням [32].

Таблиця 1.1

Цитокін	Механізм впливу
1	2
ФНП-α	• Індукція апоптозу та некрозу ниркових клітин різних типів. • порушення кровотоку в судинах клубочків, пов'язане з дисбалансом медіаторів, які проявляють вазоконстрикторні та вазодилатаційні властивості. • Підвищення продукції клітинами мезангія хемоатрактантів для нейтрофілів та макрофагів, що сприяє запальній інфільтрації клубочків. • Індукція утворення реактивних форм кисню в мезангіальних клітинах. • Підвищення секреції речовин, яким притаманні прокоагулянтні властивості • Підвищення реабсорбції натрію та рідини в проксимальних канальцях.
IL-1	• Підвищення експресії молекул міжклітинної адгезії ендотелієм судин клубочків, епітелієм канальців та мезангіальними клітинами. • порушення внутрішньоклубочкової гемодинаміки за рахунок підвищення активності фосфоліпази A2 та синтезу простагландину E2. • Підвищення чутливості клітин клубочків до ангіотензину II. • Ріст синтезу гіалуронату клітинами проксимальних канальців
IL-6	• Стимуляцію проліферації клітин мезангія клубочків. • Підвищення продукції клітинами мезангія молекул міжклітинної адгезії та екстрацелюлярного матриксу.

Продовж. табл.1.1

1	2
	• Стоншення базальної мембрани клубочків та підвищення екскреції альбуміну із сечею.
IL-18	• Підвищення експресії молекул міжклітинної адгезії ендотелієм судин клубочків. • Підвищення синтезу ФНП-α, IL-1 та інтерферону-Г різними типами клітин. • Підвищення експресії рецепторів прозапальних цитокінів

Окрім системного запалення, суттєву роль відіграє локальне утворення прозапальних цитокінів в тканині нирок, що стимулюється ангіотензином II та альдостероном через систему білка NF- κ B. За рахунок розвитку стійких порушень гемодинаміки в клубочках, морфологічних змін інтерстиція та білкового навантаження на клітини проксимальних канальців при ДН може спостерігатися «самопідтримка» запальних процесів в нирках [116, 117, 156, 157, 204].

Тісний зв'язок із запаленням мають проліферативні та процеси фіброзу в нирках. Центральну роль в їх регуляції відіграє трансформуючий фактор росту- β (ТФР- β) [211]. Під його дією та інших факторів відбувається перебудова матриксу клубочків: індукується синтез колагенів I, III, IV, VI типів, фібронектину, остеопонтину, тенасцину, ламініну, пригнічується утворення гепарансульфат-вмісних протеогліканів, знижується активність металопротейназ, які забезпечують деградацію білків позаклітинного матриксу. Підвищення вмісту в тканинах нирок ТФР- β при ДН обумовлено впливом підвищеної концентрації глюкози на експресію мезангіальними клітинами тромбоспондину-1, активатора ТФР- β . В патогенезі ДН суттєву роль також відіграє підвищення експресії різними типами клітин молекул міжклітинної адгезії та хемоатрактантів. Надлишкове утворення цих сполук є результатом дії протизапальних цитокінів (особливості ФНП- α), що призводить, в свою чергу, до розвитку запальної інфільтрації клубочків [60, 68, 158, 161, 175].

Рівень ФНП- α в сироватці крові пацієнтів, що страждають на ЦД в середньому в 3-4 рази вище, ніж у здорових осіб. За даних деяких авторів, підвищення концентрації цього цитокіну спостерігається задовго до появи порушень вуглеводного обміну, корелює із вираженістю інсулінорезистентності та ймовірно, таким чином, розглядається як маркер підвищеного ризику виникнення ЦД 2-го типу. При розвитку мікроальбумінурії на тлі ДН відмічається подальше підвищення рівня ФНП- α . Результати

експериментальних досліджень свідчать про те, що величина добової екскреції білка із сечею позитивно корелює із концентрацією матричної РНК ФНП- α в кірковій зоні нирок та концентрацією самого цитокіну в сечі [155, 180, 218, 219].

Сироватковий рівень ІЛ-6, на відміну від ФНП- α , значно підвищується лише при розвитку протеїнурії на тлі ДН. За даними морфологічних досліджень підвищення концентрації матричної РНК ІЛ-6 в кірковій зоні нирок корелює із проліферацією мезангіальних клітин клубочків та змінами БМ [33, 207].

Концентрація ІЛ -18 в сироватці крові та сечі у пацієнтів із ДН корелює із величиною добової екскреції білка із сечею та її підвищення в динаміці. Крім цього, підвищення сироваткової концентрації цього цитокіну асоційоване із підвищенням екскреції β 2-мікроглобуліна, який є маркером тубулоінтерстиціального пошкодження [118, 119, 224].

Варто зазначити, що сироватковий рівень СРБ часто використовується в клінічній практиці з метою оцінки активності запальних процесів в організмі, досить неспецифічний та має слабку кореляцію із основними ознаками пошкодження нирок на тлі ЦД, однак в загальнопопуляційних дослідженнях було доведено, що зниження швидкості клубочкової фільтрації асоційоване із підвищенням концентрації СРБ [60, 80, 108, 115, 208].

Роль запальних процесів в розвитку та прогресуванні ДН підтверджується даними щодо поліморфізму генів прозапальних цитокінів. Різними групами авторів було ідентифіковано однонуклеотидні заміни в генах ІЛ-1 та ІЛ-6, а також динуклеотидні повтори в гені ФНП- α , наявність яких асоційована із підвищеним ризиком ураження нирок у пацієнтів із ЦД. Аналогічні дані отримані і у відношенні поліморфізму генів ангіотензиногену, ангіотензин-перетворюючого ферменту та рецептора ангіотензиногену II типу I [220].

Крім цього, існує ряд механізмів опосередкованого впливу системного запалення на нирки. Зокрема, під дією прозапальних цитокінів відбувається апоптоз кардіоміоцитів та ендотеліальних клітин, а також дестабілізація атеросклеротичних бляшок, внаслідок чого прискорюється прогресування

серцево-судинних захворювань. Крім цього, ФНП- α та ІЛ-6 сприяють розвитку анемії, оскільки гальмують проліферацію та диференціацію клітин еритроїдного ряду в кістковому мозку та викликають секвестрацію заліза в ретикулоендотеліальній системі. Гіпоксія, обумовлена анемією та серцевою недостатністю, призводить до стимуляцію симпатичної нервової системи, ниркової вазоконстрикції, активації ренін-ангіотензинової системи, затримки натрію та рідини в організмі, що прискорює прогресування ДН [42, 222, 226].

1.3. Фітозасоби в лікуванні цукрового діабету 2-го типу та його пізніх ускладнень

Тактика лікування ЦД 2-го типу повинна бути спрямована на нормалізацію патогенетичних ланок, що лежать в основі захворювання: на зменшення інсулінорезистентності та поліпшення функції клітин. Фармакотерапію призначають у тих випадках, коли дієтичні заходи та збільшення фізичного навантаження протягом 3 місяців не дозволяють досягти мети лікування. Загальні напрямки лікування ЦД 2-го типу включають превентивні заходи (на стадії порушення толерантності до глюкози), агресивну тактику лікування, спрямовану на раннє досягнення цільових значень глікемії для досягнення компенсації вуглеводного обміну [61, 73, 101].

Існує кілька груп цукрознижувальних препаратів. Вони різні за складом і механізмом дії. Цукрознижувальні засоби класифікують за основним ефектом від їх застосування, точкою прикладання (тобто за органами, на які вони впливають) та за АТС-класифікацією [26, 102, 125].

Класифікація за основним ефектом включає гіпоглікемічні та антигіперглікемічні препарати. Гіпоглікемічні препарати: глініди і сульфонілсечовина – сприяють секреції ендогенного інсуліну і можуть спровокувати гіпоглікемію. До антигіперглікемічних препаратів належать бігуаніди, інсулінові потенціатори і глюкозидази. Препарати цієї групи активізують утилізацію глюкози, не впливаючи на бета-клітини підшлункової

залози, завдяки чому рівень інсуліну залишається стабільним. Не змінюється і показник глюкози, а значить, гіпоглікемія не виникає [22, 61, 73, 101].

Окрім синтетичних лікарських засобів для лікування ЦД 2-го типу на сьогодні актуальним є вивчення та впровадження антидіабетичних препаратів природного походження. На сьогодні відомо понад 150 рослин, яким притаманний антидіабетичний ефект. Перевагою препаратів рослинного походження є те, що вони малотоксичні, діють м'яко, не кумулюються, можуть використовуватися тривалий час у комбінації з іншими рослинними препаратами і хіміотерапією, можна призначати хворим будь-якого віку незалежно від ступеня важкості ЦД. Фітотерапія може бути застосована як монотерапія у поєднанні з дієтотерапією (у разі легкого перебігу) або як допоміжна – у поєднанні з таблетованими цукрознижуючими препаратами або інсуліном. Така комплексна терапія зумовлює досягнення компенсації захворювання, його стабілізацію, а інколи дозволяє зменшити дозу інсуліну чи таблетованих цукрознижуючих засобів. Конкретні механізми гіпоглікемічної дії окремих рослин та фітопрепаратів ще недостатньо вивчені. Загалом антидіабетична дія рослин обумовлена наявністю в них БАР: вітамінів, ферментів, гормонів, макро- і мікроелементів, алкалоїдів, ефірних олій, фітонцидів та інших [64, 88, 90, 154].

Сьогодні науковцями висувуються чотири гіпотези щодо механізму гіпоглікемічної дії фітопрепаратів [88, 102, 106].

1. БАР рослин збагачують організм лужними радикалами, а тому в слабколужному розчині в присутності $\text{Ca}(\text{OH})_2$ глюкоза перетворюється на фруктозу або маннозу, для її засвоєння не потрібно інсуліну [187].

2. Цукрознижувальні рослини містять гуанідин, який є сильною основою і діє подібно до препаратів похідних сульфосечовини [102].

3. Під впливом фітопрепаратів посилюється відновлення β -клітин в острівцях Лангерганса [187].

4. Здатність рослинних речовин регулювати імунні механізми за допомогою імуномодуляторів [88].

Лікарські рослини нормалізують вторинні порушення обміну речовин, загалом, і гормонів, зокрема, забезпечують профілактику ускладнень з боку сітківки очей, печінки, серцево-судинної, сечовидільної, нервової, опорно-рухової та інших систем організму хворого. Фітопрепарати підбирають для кожного хворого індивідуально, враховуючи характер захворювання і вираженість супутньої патології, особливостей організму, умов його життя [88].

Враховуючи те, що основним у лікуванні ЦД 2-го типу є досягнення нормалізації вуглеводного, білкового і жирового обмінів, профілактика та лікування гострих і хронічних ускладнень і наслідків, обов'язковою умовою фітотерапії є комплексність із використанням різних фітопрепаратів із різними механізмами дії за рахунок чого буде досягнутий одночасний фармакологічний вплив на кілька ланок патогенезу хвороби, що дозволить швидше досягнути бажаного результату.

Висновки до розділу 1:

1. Велика соціальна значимість ЦД полягає в тому, що він призводить до ранньої інвалідизації й летальності, обумовлених наявністю судинних ускладнень діабету: мікроангіопатій (ретинопатія і нефропатія), макроангіопатій (інфаркт міокарда, інсульт, гангрена нижніх кінцівок), нейропатій. Зміни судинного русла при ЦД носять системний характер, однак в першу чергу порушення переважають на рівні мікроциркуляції із розвитком специфічних дегенеративних змін в БМ капілярів та артеріол із послабленням мікроциркуляторної ауторегуляції.

2. Аналіз літературних джерел вітчизняних та зарубіжних науковців дозволив встановити, що патогенез ДН є складний і багатокомпонентним, в основі якого лежить порушення вуглеводного обміну, гіперліпідемія, гемодинамічні розлади, зсуви гемокоагуляції, а також пошкодження функції БМ клубочків та ендотеліальних клітин.

3. Ключовими ланками в патогенезі ДН на тлі ЦД 2-го типу є порушення функціональної активності ендотелію та зміни цитокінового пулу. Однак робіт, в яких відображений комплексний підхід до вивчення механізмів пошкодження ниркового апарату при експериментальному стрептозотоциновому діабеті, на сьогодні не проводилося. Тому, враховуючи полісистемність ураження судин при ЦД 2-го типу актуальним та доцільним є детальне вивчення змін показників функціональної активності ендотелію, цитокінового пулу та гострофазових білків плазми крові, а також АОЗ та ПОЛ при пізніх ускладненнях ЦД 2-го типу (зокрема, ДН), а також патогенетичної корекції виявлених порушень з метою попередження подальшого прогресування судинної патології.

4. На сьогодні фармакотерапія ЦД 2-го типу включає не лише застосування синтетичних лікарських засобів, а й препаратів природного походження, перевагою яких є те, що вони малотоксичні, діють м'яко, не кумулюються в організмі, можуть застосовуватися протягом тривалого часу як в монотерапії, так і у комбінації з іншими рослинними препаратами і хіміотерапією, можна призначати хворим будь-якого віку незалежно від ступеня важкості ЦД.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріали дослідження

Експериментальні дослідження проведено на 114 нелінійних щурах обох статей масою тіла 180-200 г, вирощених у розпліднику віварію Одеського національного медичного університету Міністерства охорони здоров'я України, які знаходилися на стандартному харчуванні і водному раціоні згідно санітарно-гігієнічним нормам: при температурі 20-22 °С, вологості не більше 60-70 %, обсязі повітрообміну (витяжка-приплив) 8/10, світловому режимі день/ніч у стандартних алюмінієвих клітках не більше 5 тварин у кожній (Directive 2010/63/EU of European Parliament and Council on the protection of animals used for scientific purposes) [27].

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. [27, 29, 67]. Всі больові маніпуляції були проведені під етамінал-натрієвим наркозом (вводили дозою 40 мг/кг внутрішньоочеревинно). Евтаназію проводили шляхом передозування ефірного наркозу або шляхом цервікальної дислокації. Комісією з біоетики Одеського національного медичного університету МОЗ України порушень морально-етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено.

Експериментальні моделі дослідження

Для відтворення ЦД 2-го типу використовували стрептозотоцинову модель: щурам одноразово внутрішньовенно вводили стрептозотцин дозою

65 мг/кг [27]. Розчин стрептозотоцину готували в 0,1 М цитратному буфері рН 4,5. За 15 хвилин до його введення внутрішньоочеревинно вводили нікотинамід дозою 230 мг/кг, який дозволяє зберегти до 40 % запасів панкреатичного інсуліну у дослідних щурів, за рахунок чого у тварин розвивається помірна та стабільна базальна гіперглікемія. Дана модель дозволяє відтворити головні патогенетичні ланки ЦД 2-го типу: порушення секреції та дії інсуліну та розвиток інтолерантності до вуглеводів, відносна недостатність секреції інсуліну у відповідь на підвищений рівень глюкози та збереження секреторної реакції на неглюкозні секретогени (в тому числі на сульфаніламідні препарати) [11, 37, 72, 76].

Для відтворення ДН раціон експериментальних щурів базувався на високожировому харчуванні. На 6 тиждень у тварин відзначали ознаки ДН – протеїнурію, зниження швидкості клубочкової фільтрації [1, 3, 98, 104, 109].

Розподіл експериментальних тварин з урахуванням мети та завдань експерименту наведено в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Розподіл тварин по серіям експериментальних досліджень

№	Назва експерименту	Кількість та вид тварин
1.	Вивчення змін фізіологічних та біохімічних показників	18 щурів обох статей
2.	Дослідження ендотеліальної дисфункції	18 щурів обох статей
3.	Вивчення прозапальних цитокінів, системи АОЗ та ПОЛ, а також функціонального стану еритроцитів	18 щурів обох статей
4.	Дослідження впливу антиоксидантної терапії та L-аргініну	60 щурів обох статей
ВСЬОГО:		114 тварин

На першому етапі дослідження щодо з'ясування патогенетичних ланок ДН на тлі ЦД 2-го типу експериментальні тварини були розподілені на 3 групи:

1 група – інтактний контроль – щури, які внутрішньошлунково отримували дистильовану воду (1 група);

2 група – тварини, яким відтворювали ЦД 2-го типу;

3 група – щури, яким моделювали ДН на тлі ЦД 2-го типу.

На наступному етапі було проведено дослідження впливу біофлавоноїдів в комплексі з L-аргініном на прогресування мікроангіопатичних ускладнень на тлі ЦД 2-го типу. З цією метою щури були розподілені на наступні групи:

1 група – тварини, які отримували метформін в його ефективній дозі 60 мг/кг;

2 група – щури, які отримували метформін, біофлавоноїди та L-аргінін протягом 15 діб;

3 група – тварини, яким вводили метформін, біофлавоноїди та L-аргінін протягом 30 діб.

З метою розробки патогенетичного підходу до профілактики та лікування ДН на тлі ЦД 2-го типу проводили вивчення впливу біофлавоноїдів виробництва компанії «Ingredients for Life» (Україна) (табл. 2.2) та L-аргініну в його ефективній дозі протягом 30 діб від початку введення.

Згідно літературних даних досліджуваний комплекс біофлавоноїдів є корисним для профілактики і в складі комплексного лікування, а саме:

- анемій та інших порушень показників крові;
- атеросклерозу, гіпоксій, початкових стадій гіпертонічної хвороби та інших судинних і серцево-судинних захворювань;
- ЦД 2-го типу;
- імунодефіцитних станів;
- йододефіцитних станів;
- неврозоподібних і астено-невротичних станів, головного болю;
- при хіміопроменевій терапії онкозахворювань;
- запальних процесів, травм, в до- і післяопераційному періоді;

- захворювань печінки (гепатити, гестози, цирози);
- вірусних та бактеріологічних інфекцій;
- різних розладів статеві сфери, в період передменопаузи і в клімактеричному періоді;
- виразкової хвороби шлунка та 12-палої кишки;
- простудних захворювань (грип, ГРЗ, бронхіти).

Таблиця 2.2

Склад та властивості комплексу біофлавоноїдів

Назва продукту	Склад і стандартизація	Властивості
Cratavin @	Екстракт <i>Crataeva nurvula</i> 1.5% люпеол 25% сапонінів 2% таннінів	Протизапальні властивості
Curcumin C3 Complex	Екстракт куркуми довгої (<i>Curcuma longa</i>) куркуміноїди 95%	Куркуміноїди сприяють пригніченню активації ФНП-α, запального процесу і його основних проявів; антиоксидантні властивості.
D-Mannose	D-Манноза	Притаманна бактерицидна активність
Fennel SCFE	Екстракт фенхеля звичайного (<i>Foeniculum</i>) 75% жирних кислот	Підвищує секреторну активність травних залоз, сприяючи травленню.
Selenium-SELECT	Біодоступний селен	Достатнє надходження селена в організм знижує ймовірність появу пухлинних новоутворень.
Uva Ursi	Екстракт мучниці звичайної (<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>) 10%	Притаманні сильні бактерицидні властивості.

Досліджувані біофлавоноїди вводили внутрішньошлунково одноразово вранці протягом 30-ти діб: 1 таблетку подрібнювали та розчиняли в 10 мл води; L-аргінін вводили в його ефективній дозі (300 мг/кг) – оскільки він володіє ендотелійпротекторною дією та рекомендований в терапії пізніх ускладнень ЦД [29].

Дослідження проводили порівняно з аналогом за фармакологічною антидіабетичним засобом з групи бігуанідів – таблетками метформіну (Метформін САНДОЗ®, табл., 500 мг, Польща) дозою 60 мг/кг маси тварин, яку розраховували за допомогою коефіцієнту видової чутливості: середня добова доза для людини масою тіла 70 кг складає 61 1000 мг/добу; добова доза для щурів 60 мг/кг метформіну на добу [70].

Дози досліджуваних препаратів вводили з урахуванням загальноприйнятих в експериментальній фармакології коефіцієнтів видової стійкості Ю. Р. Риболовлева один раз на добу [70].

Методики дослідження

Для підтвердження розладів з боку сечовидільної системи проводили визначення *спонтанного діурезу*: дослідні групи щурів поміщали в індивідуальні обмінні клітки, пристосовані для реєстрації кількості випитої води та виділеної сечі. Для групи тварин із модельованим ЦД визначення показника проводили через 1 тиждень; у групи щурів з ДН – через 40 тижнів після початку експерименту [94].

Рівень *екскреції білка* визначали колориметричним методом за бромфеноловим синім «Vital Diagnostics» (Росія), креатинін сироватки крові (із наступним розрахунком *кліренсу креатиніну*) визначали за методом Яффе із використанням набору «Pliva-Lachema» (Чехія) [46].

З метою аналізу механізму зміни екскреції води і електролітів при ЦД та ДН на тлі ЦД 2-го типу вивчали процеси *клубочкової фільтрації* і *канальцевої реабсорбції*. Клубочкову фільтрацію визначали за кліренсом ендogenous креатиніну, коефіцієнт його очищення визначається відношенням концентрації

креатиніну в сечі до концентрації в плазмі крові [94].

З метою проведення *морфологічного дослідження* матеріал, отриманий із нирок, фіксували протягом 24 годин в 10 %-му розчині нейтрального формаліну (рН 7,4), зневоднювали та заливали в парафін за загальноприйнятою методикою. На роторному мікроскопі виготовляли зрізи товщиною 3-5 мкм, які потім забарвлювали гематоксилін-еозином за Массоном [62].

Аналіз мікропрепаратів проводили під мікроскопом Mikros 400 (Австрія), мікрофотографування мікроскопічних зображень здійснювали цифровим фотоапаратом Nikon Cool Pix 4500. Фотознімки обробляли на комп'ютері Pentium 2,4 GHz за допомогою програми Nikon View 5.

Для вивчення змін ендотелію використовували наступні маркери дисфункцію ендотелію: концентрація ендотеліна-1 в крові, активність фактора Вільбранда та рівень ендотеліальної та індукцибельної NO-синтаз [94].

Рівень глюкози у крові тварин визначали глюкозооксидазним методом з використанням наборів хімічних реактивів «Д-глюкоза», виробництва «ФілісІтДіагностика» (Україна) [46].

Концентрацію *глікозильованого гемоглобіну* визначали імунотурбідиметричним методом з використанням набору фірми Erba Lachema (Чехія) [46].

Кількість холестерину проводили за методом Ілька, який оснований на кольоровій реакції: присутній в плазмі крові холестерин дає кольорове забарвлення при обробці сумішшю оцтового ангідриду, сірчаної та оцтової кислот.

Для цього в суху пробірку вносили 2,1 мл реактиву Лібермана-Бурхарда, дуже повільно по стінці пробірки додавали 0,1 мл сироватки негемолізованої крові, пробірку струшували, а потім поміщали до термостату на 20 хв при 37°C. При цьому спостерігали появу смарагдово-зеленого забарвлення, яке колориметрували на ФЕЦ'ї в кюветі з товщиною стінки 0,5 см при червоному світлофільтрі (630-690 нм) проти реактиву Лібермана-Бурхарда. Отриману на ФЕЦ'ї оптичну щільність використовували для визначення концентрації

холестерину за калібрувальним графіком. Знайдену концентрацію холестерину множили на 1000 (оскільки сироватки в досліді брали 0,1 мл). Коефіцієнт перерахунку в одиниці СІ (ммоль/л) дорівнює 0,0258 [94].

Вміст *ЛПВЩ та апо-В-вмісних ліпопротеїнів* (сума ліпопротеїнів низької щільності та ліпопротеїнів дуже низької щільності – апоВ-ЛПД) визначали у сироватці крові турбідиметричним методом [94].

Визначення *концентрації ендотеліна-1* в крові проводили з використанням імуноферментних наборів «Ендотелін 1» фірми «Biomedica gruppe» (Австрія).

Рівень фактора Віллебранда досліджували з використанням набору реагентів «Віллебранд-тест» (НПО «Ренам», Росія) в цитратній плазмі. Метод базується на здатності фактору Віллебранда викликати аглютинацію тромбоцитів в присутності антибіотика ристоцетину (ристоміцину). Здатність до такої аглютинації зберігається у тромбоцитів після їх фіксації формальдегідом, коли повністю втрачається реакція на інші індуктори агрегації.

Концентрацію С-реактивного білка (СРБ) визначали в сироватці крові за допомогою напівкількісного методу латексної аглютинації з чутливістю 0,8-1,0 мг/л СРБ [94].

Принцип методу полягає в тому, що сироватка крові, яка містить білок гострої фази – С-реактивний протеїн, утворює преципітат, який нагадує пластівці при взаємодії з специфічною преципітуючою імунною сироваткою до цього антигену. Для цього сироватку крові отримували звичайним шляхом із 0,5 мл крові. Попередній облік результату реакції проводять через 4 години, після чого капіляр зі штативом залишають на добу при кімнатній температурі чи ставлять на той же час до холодильної шафи (температура від 2 до 8°C).

Через 24 години проводять кінцевий облік результату реакції. Осадження преципітату (пластівці, осад) в капілярі вказує на наявність СРБ в досліджуваній сироватці. Наявність преципітату в капілярі висотою 1 мм оцінюється одним «+» - реакція слабкопозитивна; преципітат висотою 2-3 мм

оцінюють відповідно «++» чи «+++» - реакція позитивна; преципітат висотою 4 мм та більше оцінюють чотирма «++++» - реакція різко позитивна [94].

НО-синтазну активність визначали спектрофотометричним методом за приростом вмісту нітриту в реакційній суміші, що містить 50 мМ дигідрофосфату калію (рН 7), 1 мМ хлориду магнію, 1 мМ НАДФН і 2 мМ хлориду кальцію (для вимірювання активності eNOS або 4 мМ EDTA (для зв'язування ендogenous кальцію при вимірюванні активності iNOS), протягом 15 хвилин при 37°C [94].

Фактор некрозу пухлини (TNF-α) характеризували за набором «альфа-ФНП-ІФА-БЕСТ» (ВЕКТОР-БЕСТ, Росія). Набір призначений для кількісного визначення TNF-α в біологічних рідинах і культуральних середовищах, який базується на твердофазному «сендвіч» - варіанті імуноферментного аналізу із застосуванням моно- та поліклональних антитіл до TNF-α. Діапазон вимірюваних концентрацій 0 - 250 пг/мл. Мінімальна концентрація не перевищує 2 пг/мл. На першій стадії аналізу досліджувані і контрольні зразки інкубували в лунках з іммобілізованими антитілами. Наявні в зразках інтерлейкіни зв'язувалися з іммобілізованими антитілами. Матеріал, який не зв'язався, видаляли відмиванням. Зв'язаний інтерлейкін взаємодівав при інкубації з кон'югатом № 1 (антитіла до будь-якого з інтерлейкінів з біотином). Незв'язаний кон'югат видаляли відмиванням. На третій стадії зв'язаний кон'югат № 1 взаємодівав при інкубації з кон'югатом № 2 (стрептавідин з пероксидазою хрому). Після третього відмивання кількість зв'язаного кон'югату № 2 визначали кольоровою реакцією з використанням субстрату пероксидази хрому - перекису водню і хромогена - тетраметілбензидина. Реакцію зупиняли додаванням стоп-реагенту і вимірювали оптичну щільність розчинів в лунках при довжині хвилі 450 нм. Інтенсивність жовтого забарвлення пропорційна концентрації, що міститься в зразку інтерлейкіну. На підставі калібрувального графіка розраховували концентрацію інтерлейкіну в аналізованому зразку.

Рівень резистину визначали імуноферментним сендвіч-методом за допомогою набору реактивів BioVendor (Чехія) [94].

Рівень фібриногену вивчали гравіметричним методом за Р. А. Рутберг (1961). Утворений після зсідання плазми фібрин швидко висушували та за масою згустку визначали вміст фібриногену в плазмі [94].

В пробірку для центрифугування вносили 0,5 мл плазми, додавали 0,2 мл 5 % розчину кальцію хлориду та залишали при кімнатній температурі на 45 хв. Згусток, що утворився переносили скляною паличкою на фільтр та просушували іншим фільтром до повітряно-сухого стану, потім згусток фібрину зважували на терезах та розраховували масу фібриногену за формулою:

$$\text{Фібриноген (г/л)} = 0,222 \times \text{М згустку} \quad (2.1).$$

Інтерлейкін-1 β (IL-1 β) визначали за набором реагентів «Інтерлейкін-1 β -ІФА-БЕСТ» (ВЕКТОР-БЕСТ, Росія) для імуноферментного визначення концентрації IL-1 β в біологічних рідинах і культуральних середовищах. Метод заснований на твердофазному «сендвіч» - варіанті імуноферментного аналізу із застосуванням моно- та поліклональних антитіл до IL-1 β . Набір розрахований на визначення в діапазоні концентрації 0 - 250 пг/мл. Мінімальна концентрація не перевищує 1 пг/мл [94].

Рівень інтерлейкіну-2 (IL-2) встановлювали за набором реагентів ProCon IL-2 (Росія), призначеному для кількісного визначення IL-2 в біологічних рідинах в інтервалі концентрацій 0-1000 пг/мл. Метод визначення базується на твердофазному імуноферментному аналізі із застосуванням пероксидази хрому в якості індикаторного ферменту. Один тип антитіл мобілізують на внутрішніх поверхнях лунок. Інший тип антитіл - поліклональні антитіла до молекули IL-2, знаходяться в наборі у вигляді розчину. Індикаторним компонентом є кон'югат пероксидази хрому з антивидовими поліклональними антитілами. Після інкубацій і промивок в лунки вносили кон'югат пероксидази, знову інкубували, промивали, вносили субстрат і вимірювали активність зв'язаної пероксидази з використанням автоматичного фотометра для мікропланшетів при 450 нм [94].

Інтерлейкін-4 (IL-4) досліджували за набором реагентів «Інтерлейкін-4-ІФА-БЕСТ» (ВЕКТОР-БЕСТ, Росія) для кількісного визначення в біологічних

рідинах і культуральних середовищах. Метод заснований на твердофазному «сендвіч» - варіанті імуноферментного аналізу із застосуванням моно- та поліклональних антитіл до ІІ-4. Діапазон вимірюваних концентрацій 0 – 400 пг/мл, чутливість аналізу 2 пг/мл [94].

Вивчення *глутатіонпероксидази в еритроцитах*. Метод заснований на здатності глутатіонпероксидази каталізувати реакцію взаємодії відновленого глутатіону (ВГ) з гідроперекисом бутила. Активність ферменту оцінювали за зміною вмісту ВГ в пробах до і після інкубації з модельним субстратом за допомогою кольорової реакції з дитіобіснітробензойною кислотою. Для ферментативної реакції готували гемолізат еритроцитів в співвідношенні суспензія еритроцитів: вода дистильована 1: 200. Після цього 0,2 мл гемолізату змішували з 0,73 мл 0,1 М трис-НСl буфера, що містить 0,01 % ЕДТА, 0,078% азиду натрію, 0,1 % відновленого глутатіону (рН=8,5). Суміш інкубували в термостаті при 37°C протягом 10 хв. Реакцію ініціювали внесенням в реакційну суміш 70 мкл 0,14 % розчину гідроперекису бутила. Через 5 хв інкубації реакцію зупиняли внесенням 0,2 мл 20 % розчину трихлороцтової кислоти. У контрольній пробі розчин гідроперекису вносили після осадження білка трихлороцтовою кислотою. Отримані проби центрифугували при 3000 об/хв протягом 10 хв. Супернатант використовували для визначення кількості ВГ: до 0,1 мл супернатанту додавали 2,65 мл трис-НСl буфера, що містить 0,01 % ЕДТА і 25 мкл розчину дитіобіснітробензойною кислотою. Після перемішування проби досліджували на спектрофотометрі при довжині хвилі 412 нм проти води дистильованої. Активність глутатіонпероксидази розраховували за зміною вмісту ВГ в пробах до і після інкубації з гідроперекисів бутилу. Результат представляли в мкмоль/(хв*л) [46].

Рівень *глутатіонредуктази в еритроцитах* вивчали за методом, який базується на каталітичному НАДФН-залежному перетворенні окисненої форми глутатіону в відновлену. Інтенсивність реакції оцінювали за швидкістю зниження екстинкції проб при довжині хвилі 340 нм, при якій розчин НАДФН має максимум поглинання світла (тест Варбурга). Для ферментативної реакції

0,05 мл гемолізату еритроцитів, отриманого розведенням відмитої еритроцитарної суспензії з водою дистильованою в співвідношенні 1:10, вносили в кювету спектрофотометра, що містить 1,8 мл 0,1 М калій-фосфатного буфера (рН 7,0), 1 мМ ЕДТА і 0,1 мл розчину окисненого глутатіону. Після ініціації реакції додаванням 0,1 мл розчину НАДФН кінетичним методом протягом 3 хв визначали оптичну щільність досліджуваного розчину при довжині хвилі 340 нм проти води дистильованої. Активність глутатіонредуктази розраховували за формулою, результат представляли в мкмоль/(хв*л) [46].

Метод вивчення *глутатіон-S-трансферази в еритроцитах* ґрунтується на визначенні швидкості ферментативного утворення GS-2,4-динітробензолу в реакції ВГ з 1-хлору-2,4-динітробензол, оскільки водний розчин утвореного продукту має максимум поглинання світла при довжині хвилі 340 нм. Для ферментативної реакції 0,1 мл гемолізату еритроцитів, отриманого розведенням їх суспензії водою дистильованою в співвідношенні 1:10, вносили в кювету спектрофотометра, що містить 1,2 мл 2 мМ розчину відновленого глутатіону. Реакцію ініціювали додаванням в кювету 1,2 мл 2 мМ розчину 1-хлор-2,4-динітробензолу. Паралельно досліджували контрольну пробу, в яку замість біологічного матеріалу вносили воду дистильовану. Оптичну щільність досліджуваних розчинів оцінювали при довжині хвилі 340 нм проти води дистильованої відразу ж після перемішування вмісту кювети і через 3 хв. Активність глутатіон-S-трансферази розраховували за формулою, результат представляли в мкмоль/(хв*л) [46]

Для оцінки АОЗ та ПОЛ використовували наступні показники: рівень дієнових кон'югатів (ДК), ТБК-реактивів, які є кінцевим продуктом деградації ненасичених жирних кислот мембранних фосфоліпідів. Також визначали концентрацію малонового діальдегіду (МДА), вміст каталази та ВГ [94].

Вивчення рівня дієнових кон'югатів (ДК). Первинними продуктами ПОЛ є гідроперекиси ліпідів, при утворенні яких в молекулі жирної кислоти формуються сполучені подвійні зв'язки – кон'юговані дієни. Ліпідні екстракти,

які містять гідроперекиси поліненасичених жирних кислот з такими поєднаннями в своїй структурі, володіють поглинанням в УФ-ділянці спектру: для кон'югованих дієнів при $\lambda=232$ нм. Крім цього, оптична щільність, яка вимірюється при довжині хвилі 230 нм, є сумою оптичних щільностей сполучених подвійних зв'язків (власне продуктів ПОЛ). Результат виражали в одиницях оптичної щільності на 1 мг ліпідів або 1 мл сироватки [94].

Інтенсифікацію ВР процесів у печінці оцінювали за вмістом у гомогенаті *ТБК-реактивів*, принцип методу якого базується на утворенні забарвлених комплексів, які екстрагуються бутанолом, при взаємодії продуктів ПОЛ з тіобарбітуровою кислотою [94, 46].

Вимірювання проводили не пізніше ніж 1,5 год після центрифугування. Визначали оптичну щільність досліджуваної групи проти холостої проби при двох довжинах хвиль: 535 та 570 нм в кюветі з товщиною стінки 10 мм. Результати вимірювання виражали в одиницях оптичної щільності. [94]. Розрахунок вмісту ТБК-активних продуктів проводили за формулою:

$$C = \frac{D_{535} - D_{570}}{0,156} * 16 \text{ мкмоль/г білка(мл)} \quad (2.2),$$

де: С – вміст ТБК-активних продуктів у досліджуваній групі, мкмоль/л;

D_{535} – оптична щільність досліджуваної проби при 535 нм;

D_{570} – оптична щільність досліджуваної проби при 570 нм;

0,156 – коефіцієнт молярної екстинкції комплексу МДА – тіобарбітурова кислота у л/мкмоль/см;

16 – коефіцієнт розведення сироватки.

Вміст вільного глутатіону (ВГ) визначали за методом, принцип якого ґрунтується на реакції сульфгідрильних груп з реактивом Елмана [94]. Для цього гемолізат еритроцитів змішували з 5 % метафосфорною кислотою в співвідношенні 1:1, потім центрифугували при 1500 об/хв протягом 10 хв для утворення осаду білків. Далі реагент 1, який складався з 0,143 М Na-фосфатного буферу (рН 7,5) з 6,3 мМ ЕДТА_{Na2} 0,022 мМ НАДФН, 6,7 міжн. од/мл глутатіонредуктази, змішували в пропорції 450 мкл: 50 мкл гемолізату.

Суміш інкубували 5 хв при 37⁰С у вимірювальних комірках інкубатору. Далі до 500 мкл суміші додавали 50 мкл стартового розчину – 0,2 мМ реактиву Елмана, інкубували і струшували ще 1 хв, потім визначали величину абсорбції на фільтрі 405 нм. Розрахунок вмісту загального глутатіону проводили стандартною процедурою з коефіцієнтом екстинкції комплексу $\epsilon_{405} = 11,3 \text{ мкмоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{л}$.

Активність каталази досліджували за методом Гіріна С. В. [94], принцип якого базується на зниженні вмісту перекису водню в інкубаційному середовищі, оскільки каталаза розщеплює перекис водню. Відмиті еритроцити гемолізували 0,05 М буфером трис-НСІ (рН 7,4) в співвідношенні 1:10. 0,02 мл гемолізованих еритроцитів змішували з 4 мл дистильованої води, додавали одну краплю 96 % етилового спирту та залишали на 12 год. В інкубаційну суміш, додавали 1,8 мл дистильованої води (або 1,8 мл 10 мМ розчину Н₂О₂). Зниження оптичної щільності в результаті розщеплення перекису водню в дослідній пробі вимірювали в порівнянні з контролем кожні 30 с протягом 3 хв при кімнатній температурі при довжині хвилі 230 нм. Для розрахунку активності використовували середнє значення зміни оптичної щільності за кожну хвилину протягом 3 хв, за формулою 2.3:

$$A = \frac{E_{\text{ср}}}{0,071} \quad (2.3),$$

де А – кількість ммоль Н₂О₂, розщепленого в середньому за 1 хв при додаванні в інкубаційну суміш 0,04 мл гемолізату еритроцитів (1:2000);

$E_{\text{ср}}$ – середнє значення оптичної щільності, розраховане за 1 хв.; 0,071 – коефіцієнт молярної екстинкції Н₂О₂.

Концентрацію МДА визначали за ТБК-методом [94]. Принцип методу полягає в утворенні забарвленого комплексу при взаємодії МДА з тіобарбітуровою кислотою.

Хід визначення: для дослідження 0,1 мл еритроцитів тричі промивали охолодженим ізотонічним розчином, гемолізували внесенням до пробірки 2,0

мл дистильованої води, потім додавали 1,0 мл розчину трихлороцтової кислоти і 1,0 мл розчину тіобарбітурової кислоти. Пробу прогрівали в кип'ячій водяній бані протягом 10 хв, потім центрифугували 10 хв при 3000 об/хв. Інтенсивність забарвлення виміряли при довжині хвилі 540 нм на спектрофотометрі в кюветі з товщиною шару 1 см [94].

Підрахунки проводили за формулою 2.4:

$$C \text{ (кмоль/л)} = A_{\text{оп}} \frac{10^6 \times 4 \text{ (мл)}}{1,56 \times 10^5 \times 0,1 \text{ (мл)}} \quad (2.4),$$

де 4 мл – об'єм водної фази;

0,1 мл – об'єм еритроцитарної маси;

10^6 – коефіцієнт переводу ммоль/л в кмоль/л;

$1,56 \times 10^5$ – коефіцієнт молярної екстинції.

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою програми «Statistica 8.0». Вірогідність відмінностей між показниками контрольної та дослідних груп визначали за критеріями Ст'юдента та Фішера. Рівень достовірності приймали при $p < 0,05$ [47].

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Експериментальне дослідження цукрового діабету: особливості методик моделювання / І. В. Савицький, В. М. Сарахан, І. А. Кузьменко, Н. В. Якимчук. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2017. № 6. С. 41–45.

2. Reproduction of diabetes mellitus` types in an experiment / I. V. Savytskiy, I. A. Kuzmenko, V. M. Sarahan, N. V. Yakymchuk. *World Science*. 2018. Vol. 3, № 1. P. 49–51.

3. Сарахан В. М., Савицький В. І. Способи дослідження цукрового діабету в експерименті. *Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної*

медицини (для молодих вчених та студентів) : науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 100-річчю з дня народження С. І. Корхова. Одеса, 19-20 квітня 2018 р. с. 41.

4. Моделювання експериментального цукрового діабету / В. М. Сарахан, Н. В. Якимчук, І. А. Кузьменко, І. В. Савицький. *Перспективи розвитку медичної науки і освіти* : збірник тез доповідей Всеукраїнської науково-методичної конференції, присвяченої 25-річчю Медичного інституту Сумського державного університету, м. Суми, 16–17 листопада 2017 року. Суми: Сумський державний університет, 2017. с. 81.

5. Modeling of experimental diabetes mellitus / V. M. Sarakhan et al. *Інтегративні механізми патологічних процесів: від експериментальних досліджень до клінічної практики: Матеріали VII Пленуму Українського наукового товариства патофізіологів та науково-практичної конференції, присвячених 110-річчю з дня народження члена-кореспондента АМН СРСР, професора М. Н. Зайка, м. Полтава, 11-12 жовтня 2018 р. УМСА. - Полтава : РВВ УМСА, 2018. С. 76–77.*

РОЗДІЛ 3

ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ НИРОК У ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЮ ДІАБЕТИЧНОЮ НЕФРОПАТІЄЮ НА ТЛІ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2-ГО ТИПУ

3.1. Динаміка фізіологічних показників лабораторних тварин при діабетичній нефропатії на тлі цукрового діабету 2-го типу

На початку експериментальних досліджень нами було проведено контроль у всіх групах за кількістю спожитої води за кожен добу впродовж 6-ти тижнів та добовий діурез. Окрім цього, фіксували середні величини приросту маси тіла досліджуваних тварин, визначали концентрацію глюкози в плазмі крові.

Одним з найважливіших інтегральних показників, які характеризують загальний стан лабораторних тварин, є зміна маси тіла в протязі експерименту, їх ріст і розвиток за умов дії патогенних чинників [27]. Попередній розподіл щурів на 3 експериментальні групи (інтактні тварини, щури із експериментальним ЦД 2-го типу та щури з ДН на тлі ЦД 2-го типу) був вдалим і забезпечив високу однорідність за середньою масою піддослідних тварин.

На першому етапі нашого дослідження нами були вивчені фізіологічні показники лабораторних тварин при експериментальному ЦД, зокрема: зміни маси тіла тварин, вживання води та добовий діурез.

Встановлено, що через 2 тижні маса тварин з експериментальним ЦД 2-го типу достовірно перевищувала аналогічні показники інтактних тварин в 1,1 рази та складала $303,3 \pm 7,45$ г ($275,8 \pm 8,21$ у інтактних тварин); у щурів з ДН даний показник достовірно не відрізнявся від маси тіла щурів з ЦД (рис. 3.1).

На 6-му тижні експерименту приріст маси тіла у щурів з ЦД 2-го типу становив 31 % ($370,83 \pm 9,75$ г, у інтактних тварин – $282,5 \pm 8,1$ г), у щурів з ДН – 34 % ($377,4 \pm 10,1$ г).

По мірі зростання середньої маси тіла тварин реєструвалося поступове збільшення добового споживання води, і в контрольних інтактних щурів даний показник підвищувався від $14,7 \pm 2,6$ мл в перші 2 тижні до $17,5 \pm 3,1$ мл на 6-му тижні дослідження. У групі експериментальних тварин із модельованим ЦД 2-го типу рівень добового споживання води зріс більш значимо: в перші 2 тижні він складав $16,1 \pm 3,2$ мл, то в кінці експерименту (на 6-му тижні) досягнув $20,2 \pm 3,5$ мл у розрахунку на одну тварину за добу. У щурів з експериментальною ДН на 2-му тижні експерименту добове споживання води складало $17,4 \pm 3,8$ мл, в той час як на 6-й тиждень досліджень даний показник дорівнював $26,9 \pm 4,1$ мл.

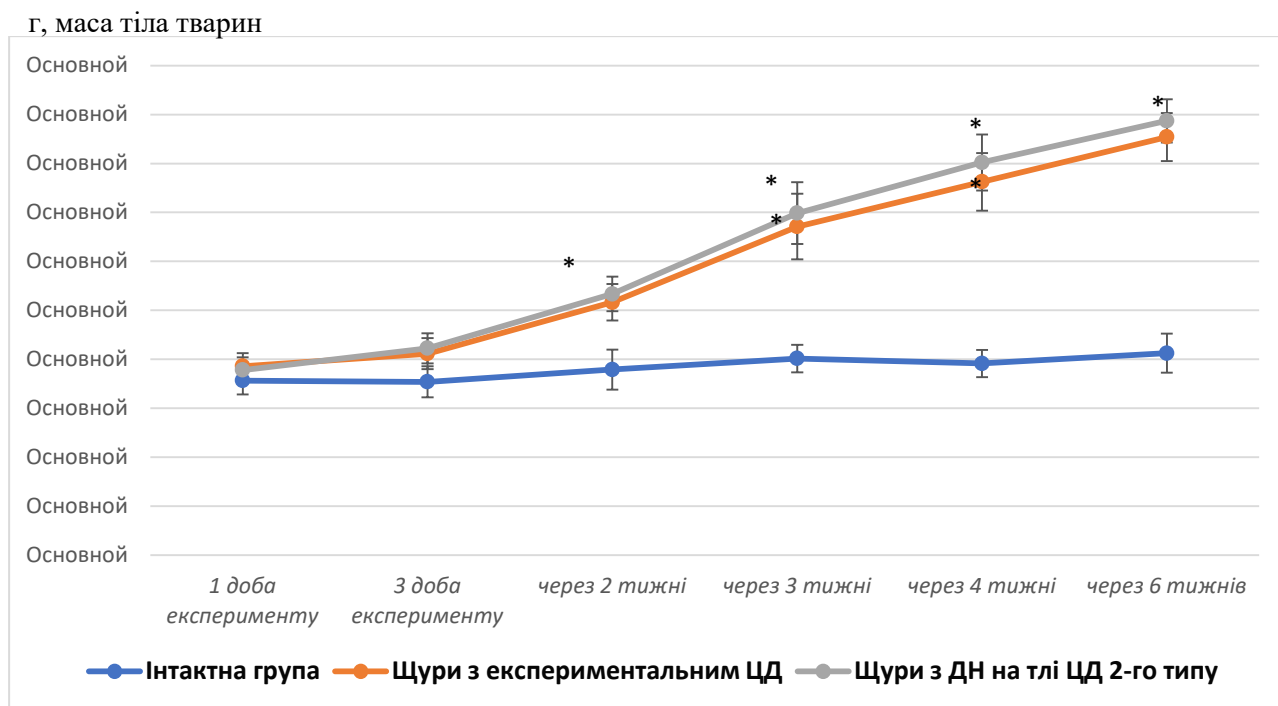


Рис. 3.1. Динаміка маси тіла щурів при експериментальному стрептозотоциновому діабеті

Примітка. * - $p < 0,05$ порівняно із групою інтактних тварин.

Також було встановлено підвищення добового діурезу: у щурів інтактною групи даний показник вірогідно не знижувався протягом всього терміну експерименту та складав $14,7 \pm 1,6$ мл, в той час як у групі тварин із відтворюваним ЦД 2-го типу даний показник змінювався від $15,2 \pm 1,8$ мл (в 1-

шу добу експерименту) до $46,4 \pm 3,8$ мл (на 6-му тижні). У щурів із ДН встановлено значне підвищення рівня добового діурезу від $16,4 \pm 2,0$ мл (в 1-шу добу експерименту) до $62,4 \pm 5,2$ мл (на кінець експерименту).

Одержані дані вказують на те, що у тварин, яким моделювали ЦД 2-го типу одноразовим введенням стрептозотоцину дозою 65 мг/кг [27], відмічали достовірний приріст маси тіла, підвищення споживання води (полідипсія) та рівня добового діурезу (поліурія). Більш виражені зміни функціонального стану організму спостерігалися у групі щурів з відтворюваною ДН на тлі ЦД 2-го типу.

3.2. Зміни біохімічних показників крові при діабетичній нефропатії на тлі цукрового діабету 2-го типу

При розвитку інсулінорезистентності в організмі інсулінозалежні тканини втрачають здатність утилізувати глюкозу крові, внаслідок чого розвивається гіперглікемія – головна діагностична ознака цукрового діабету. Тому обов'язковим дослідженням було вивчення рівня глюкози в плазмі крові.

При дослідженні рівня глюкози в крові у щурів з експериментальним ЦД встановлено достовірно виражені та стійкі зміни даного показника: на 1-шу добу експерименту в 2,6 разів; на 3 добу – в 3,4 рази; через 2 тижні – в 3,1 рази; через 3 тижні – в 3,4 рази; через 4 тижні – в 3,2 рази; через 6 тижнів – в 3,3 рази порівняно із групою інтактного контролю (рис. 3.2).

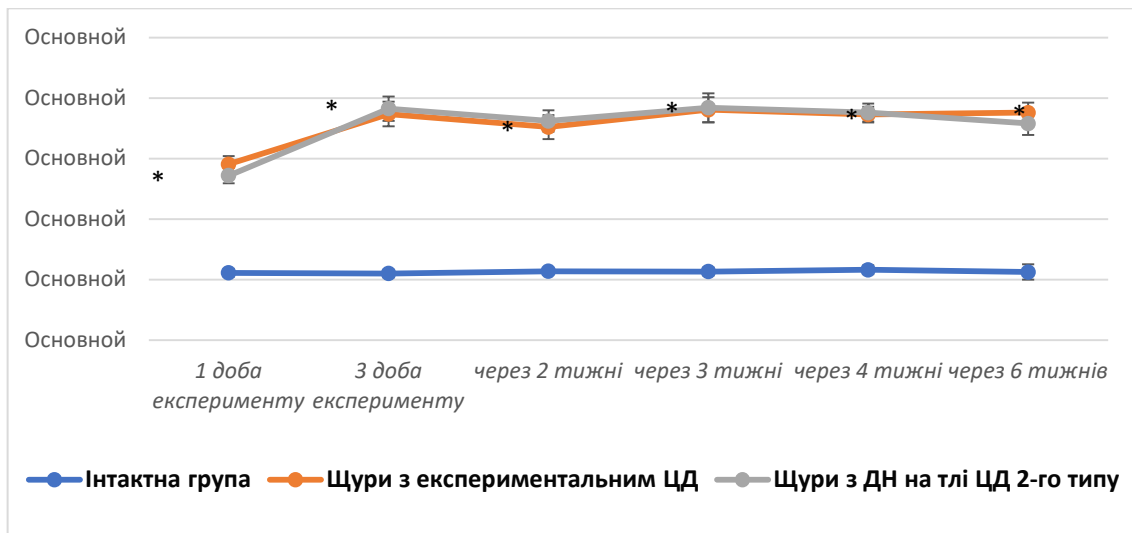


Рис. 3.2. Динаміка рівня глюкози крові при експериментальному стрептозотоциновому діабеті та ДН на тлі ЦД 2-го типу

Примітка. * - $p < 0,05$ порівняно із групою інтактних тварин.

У щурів з ДН на тлі ЦД 2-го типу показники рівня глюкози плазми мали аналогічну тенденцію до підвищення як і в групі щурів з ЦД 2-го типу.

Глікозильований гемоглобін є основним показником для оцінки компенсації ЦД та верифікації ризику розвитку мікро- та макросудинних ускладнень. Підвищення рівня глікозильованого гемоглобіну асоційоване з підвищенням ризику розвитку пізніх ускладнень як у хворих ЦД 1-го типу, так і ЦД 2-го типу.

Рівень глікозильованого гемоглобіну як у групі з ЦД 2-го типу, так і з модельованим пізнім діабетичним ускладненням недостовірно підвищувався (рис. 3.3)

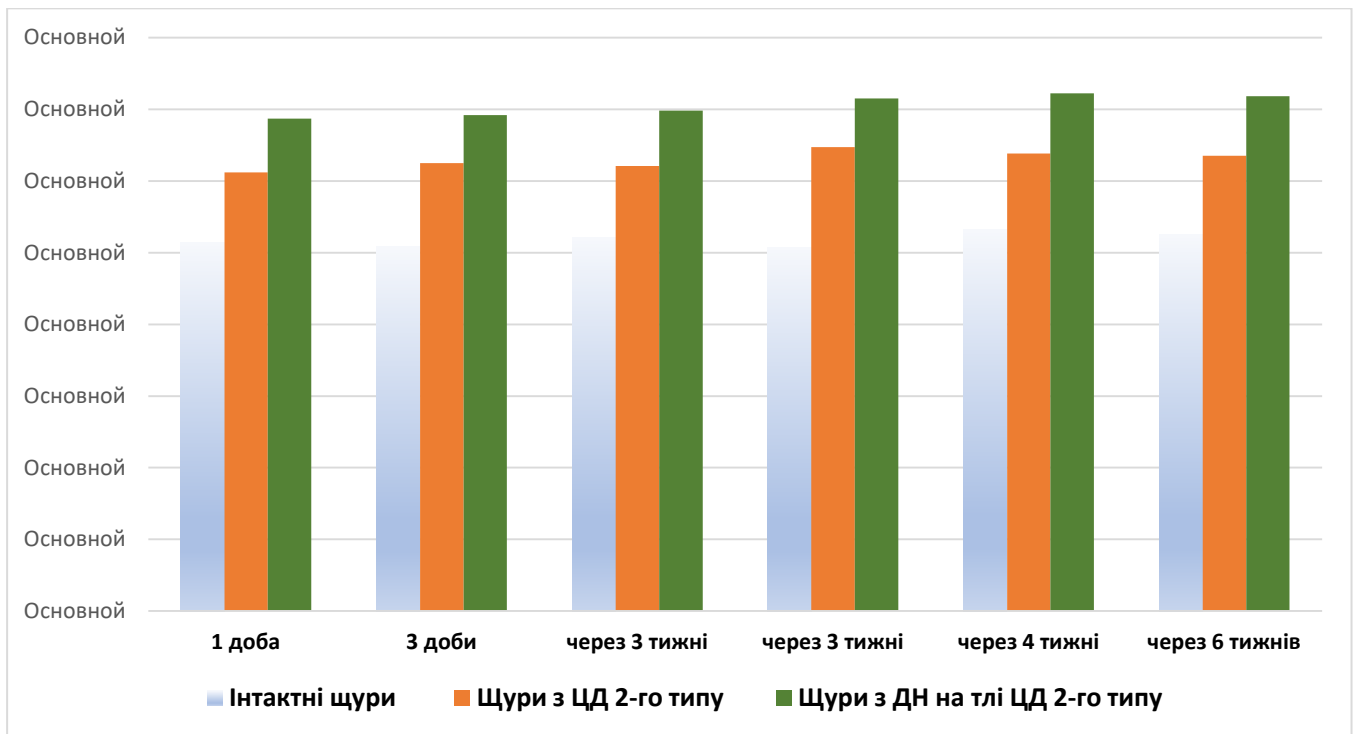


Рис. 3.3. Рівень глікозильованого гемоглобіну (%) у експериментальних щурів
($X \pm S_x$, $n=6$)

При інсулінорезистентності в організмі в крові накопичується холестерин, який відкладається в ендотелії судин, звужуючи кровотік, що призводить до ураження очей, нирок, печінки, мозку і інших важливих органів. У групі щурів з ЦД 2-го типу відмічалось незначне підвищення рівня холестерину починаючи вже з 1-ї доби експерименту, в той час як в групі щурів з ДН достовірні зміни рівня холестерину спостерігалися на 3-у добу експерименту та носили тенденцію до постійного зростання.

В експериментальних групах щурів спостерігалися наступні зміни співвідношення АпоВ-ЛП та ЛПВЩ: у бік зростання АпоВ-ЛП та зниження ЛПВЩ, що свідчить про тенденцію до атеросклеротичного пошкодження судин різного калібру.

Таблиця 3.1

Зміни біохімічних показників крові щурів при експериментальному стрептозотоциновому діабеті та ДН ($X \pm S_x$, $n=6$)

Експериментальні групи	1 доба	3 доба	через 2 тижні	через 3 тижні	через 4 тижні	через 6 тижнів
<i>Холестерин, ммоль/л</i>						
Інтактні щури	2,02±0,02	2,0±0,01	1,97±0,02	1,88±0,02	2,03±0,03	1,95±0,02
Щури з ЦД 2-го типу	2,38±0,05	2,41±0,04	2,48±0,03	2,50±0,03	2,45±0,02	2,52±0,03
Щури з ДН	2,71±0,07	2,81±0,06*	2,88±0,04*	2,86±0,02*	2,91±0,03*	2,94±0,04*
<i>АпоВ-ЛП, %</i>						
Інтактні щури	29,11±0,36	27,8±0,4	26,9±0,4	28,4±0,52	29,4±0,51	27,4±0,48
Щури з ЦД 2-го типу	30,2±2,1	30,8±2,6	32,4±3,1	33,7±2,7	34,1±2,5	33,9±2,0
Щури з ДН	35,6±3,72	35,4±4,1*	36,6±3,8*	37,1±4,0*	37,5±3,7*	37,8±3,5*
<i>ЛПВЩ, %</i>						
Інтактні щури	15,32±1,26	14,3±1,12	14,6±1,71	16,1±1,12	15,8±1,45	15,6±1,38
Щури з ЦД 2-го типу	12,74±0,81	11,81±0,7	12,01±0,6	12,8±0,74	11,6±0,68	10,9±0,48
Щури з ДН	10,8±0,54	9,87±0,62*	8,75±0,41*	8,17±0,45*	7,65±0,38*	7,12±0,35*

Примітка. * - $p < 0,05$ порівняно із групою інтактних тварин.

У тварин, які знаходилися на високожировому раціоні харчування відмічали достовірне підвищення рівня АпоВ-ЛП та зниження концентрації ЛПВЩ вже на 3-у добу дослідження.

3.3. Дослідження структурно-функціонального стану нирок за умов хронічної гіперглікемії

На першому етапі дослідження модельної патології пізнього ускладнення на тлі ЦД 2-го типу ми реєстрували виділення білка (протеїнурія) із сечею та кліренс креатиніну (рис. 3.4, рис. 3.5)

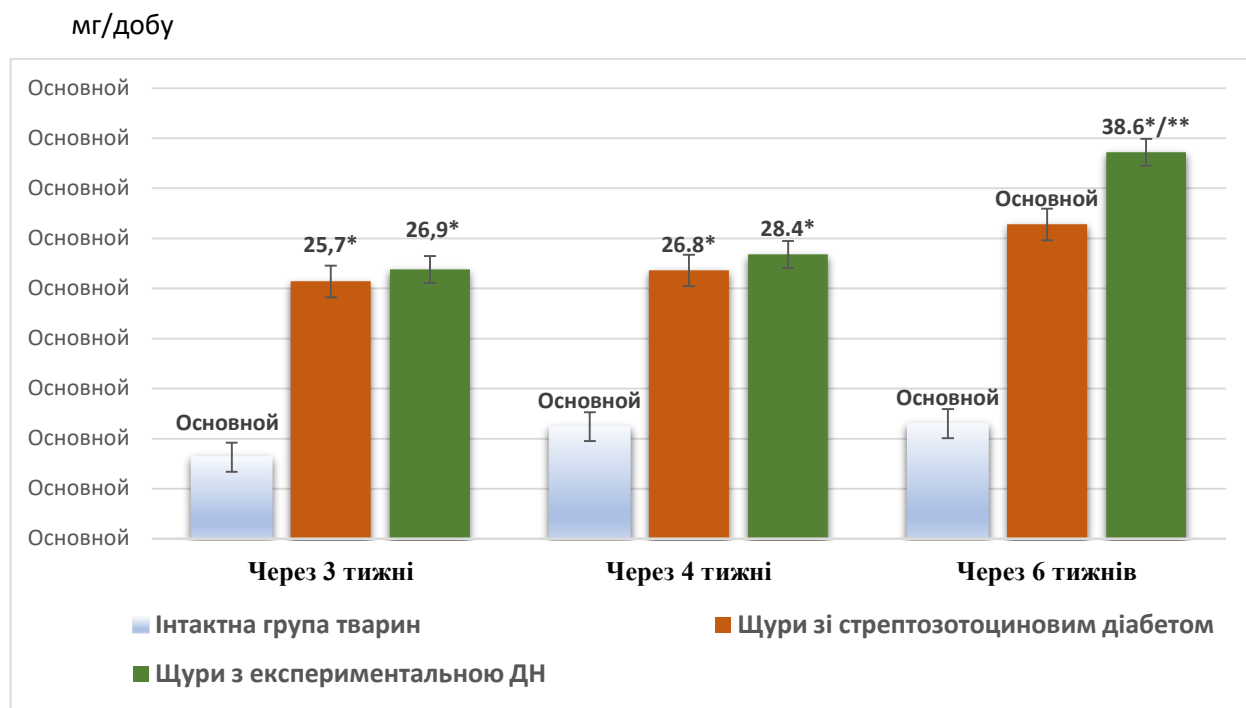


Рис. 3.4. Рівень білка в сечі у щурів з експериментальним стрептозотоциновим діабетом та ДН на тлі ЦД 2-го типу ($X \pm S_x$, $n=6$)

Примітка. *- $p < 0,05$ відносно показників контрольної групи тварин.

Встановлено достовірне підвищення білка в сечі через 3 тижні проведення експерименту у тварин із ЦД 2-го типу в 3,2 рази ($p < 0,05$) порівняно із групою інтактного контролю; у щурів з ДН на тлі ЦД 2-го типу даний показник підвищувався в 3,3 рази ($p < 0,05$) відносно інтактної групи щурів. Через 6 тижнів експерименту спостерігалася тенденція до підвищення екскреції білка із сечею: в групі тварин з ЦД 2-го типу в 2,7 разів ($p < 0,05$) відносно групи інтактних тварин та у щурів з ДН – в 3,4 рази ($p < 0,05$) відповідно. Одержані дані вказують на втрату негативного заряду мембрани ниркових клубочків внаслідок порушення синтезу протеогліканів, які входять в структуру БМ капілярів.

Кліренс креатиніну у щурів з ЦД 2-го типу підвищувався через 3 тижні від початку експерименту в 2,5 разів ($p < 0,05$) порівняно із групою інтактних тварин; у щурів з ДН на тлі ЦД 2-го типу – в 3,0 рази ($p < 0,05$) відповідно. Тенденція щодо підвищення кліренсу креатиніну у експериментальних групах

тварин із відтвореною патологією зберігалася протягом 6 тижнів проведення експерименту, що може відбуватися в результаті гіперфільтрації креатиніну та свідчить про розвиток ранньої стадії ДН.

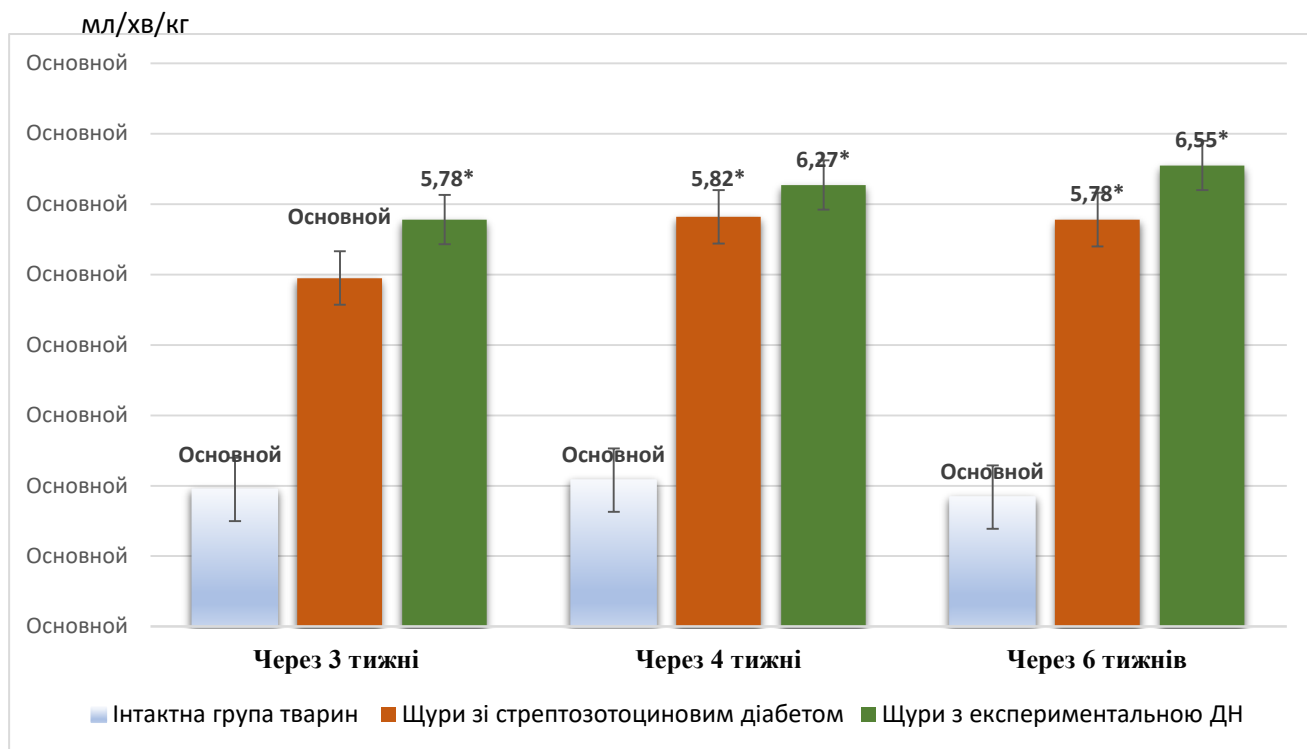


Рис. 3.5. Кліренс креатиніну у щурів з експериментальним стрептозотоциновим діабетом та ДН на тлі ЦД 2-го типу ($X \pm S_x$, $n=6$)

Примітка. *- $p < 0,05$ відносно показників контрольної групи тварин.

Відомо, що за умов хронічної гіперглікемії глюкоза проникає в ендотеліальні клітини судин, викликаючи в них патологічні зміни. Ендотелій вразливий до впливу як системної, так і внутрішньорганної гіпертензії, що розвивається в мікроциркуляторному руслі на тлі ЦД.

Порушення ниркової гемодинаміки та мікроциркуляції в нефроні призводять до зниження водно- та електролітновидільної функції нирок.

Тому наступним етапом нашого дослідження було встановлення механізму пошкодження ниркового апарату на тлі експериментального ЦД 2-го типу: вивчення показників, що характеризують клубочкову фільтрацію та каналцеву реабсорбції (основні процеси сечоутворення).

Досліджено, що при ЦД 2-го типу знижувалася клубочкова фільтрація та каналцева реабсорбція, в той час як у щурів з експериментальною ДН клубочкова фільтрація не відрізнялася від показників інтактної групи, а каналцева реабсорбція знижувалася як порівняно із інтактними щурами, так і тваринами із ЦД 2-го типу.

У групі інтактних тварин клубочкова фільтрація складала $26,18 \pm 1,45$ мм/год/100 г, у щурів із ЦД 2-го типу – $23,85 \pm 3,35$ мм/год/100 г, у щурів із ДН на тлі ЦД 2-го типу – $29,02 \pm 4,18$ мм/год/100 г (рис. 3.6).

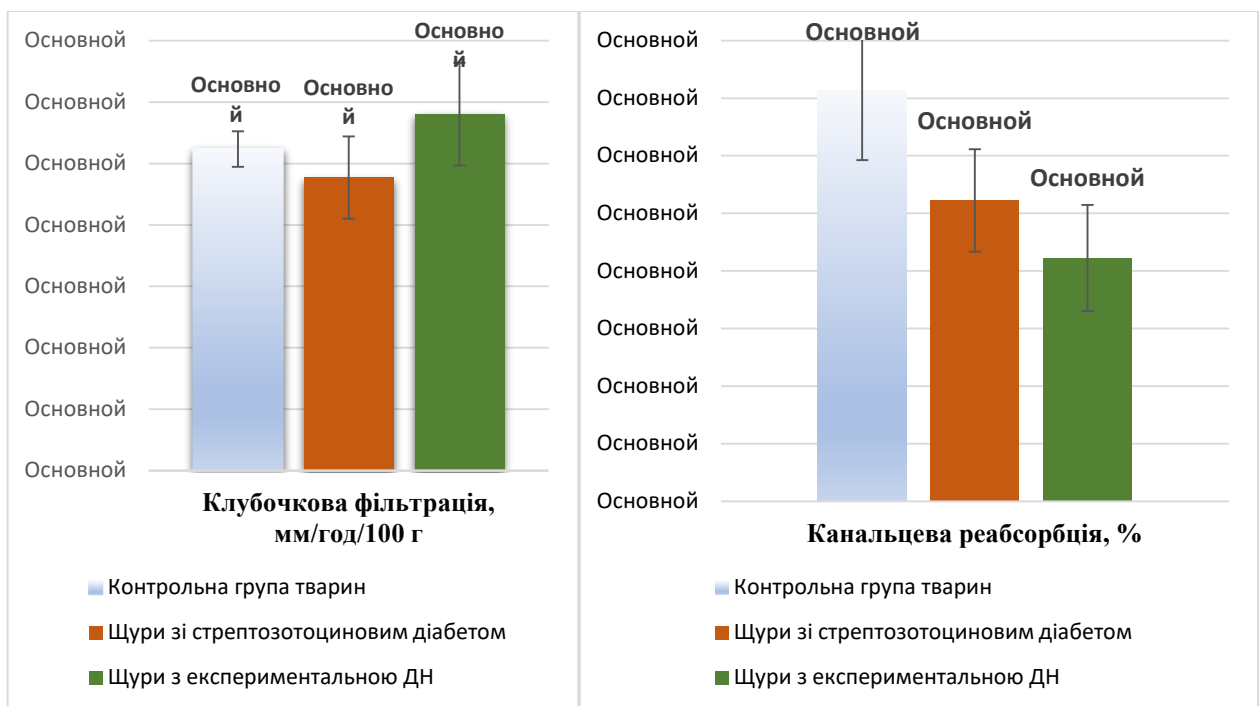


Рис. 3.6. Зміни основних процесів сечоутворення у щурів з експериментальним стрептозотоциновим діабетом та ДН ($X \pm S_x$, $n=6$)

Показник каналцевої реабсорбції складав: у інтактної групи тварин – $99,25 \pm 2,4$ %, у щурів з ЦД 2-го типу – $95,45 \pm 1,78$ %, а у тварин з ДН на тлі ЦД 2-го типу – $93,45 \pm 1,84$ % (рис. 3.6).

Відомо, що підвищення діурезу супроводжується підвищенням екскреції із сечею натрію. Оскільки натрій вільно фільтрується в ниркових клубочках та майже 99 % його знову реабсорбується в каналцях нирок, ймовірно,

підвищення екскреції натрію може бути результатом підвищення фільтраційного навантаження на нефрон чи зниження канальцевої реабсорбції.

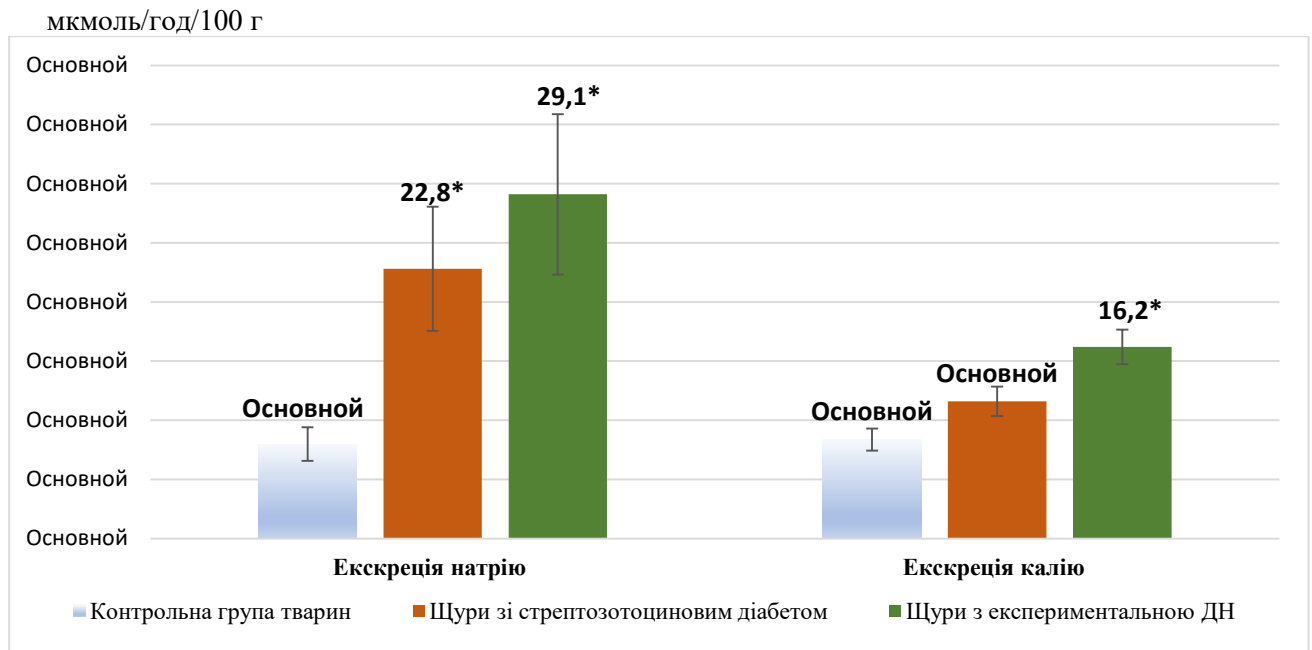


Рис. 3.7. Зміна показника екскреції натрію та калію у щурів з експериментальним стрептозотоциновим діабетом та ДН ($X \pm S_x$, $n=6$)

Примітка. *- $p < 0,05$ відносно показників контрольної групи тварин.

Аналіз одержаних результатів вказує на підвищення екскреції натрію із сечею в обох досліджуваних групах тварин (з ЦД 2-го типу та ДН). Зокрема, у групі щурів з ЦД 2-го типу – в 2,85 разів ($p < 0,05$), а тварин з ДН – в 3,6 разів ($p < 0,05$) порівняно даними інтактною групи тварин. У той же час нами встановлено підвищення виділення калію із сечею: у групі тварин із ЦД 2-го типу даний показник перевищував аналогічні дані інтактних тварин в 1,4 рази; у тварин з ДН – в 1,9 разів ($p < 0,05$) (рис. 3.7).

Отже, при експериментальному стрептозотоцинову діабеті та при ДН на тлі ЦД відмічалися незначні зміни клубочкової фільтрації та канальцевої реабсорбції. Однак як при ЦД 2-го типу, так і при ДН відмічали достовірні зміни процесів екскреції із сечею іонів натрію та калію (натрійурез та

калійурез), що пов'язано із зниження реабсорбції даних катіонів в каналцях нирок.

На заключному етапі дослідження модельної патології пізніх мікроангіопатичних ускладнень на тлі ЦД 2-го типу нами було проведено морфологічну оцінку змін ниркового апарату.

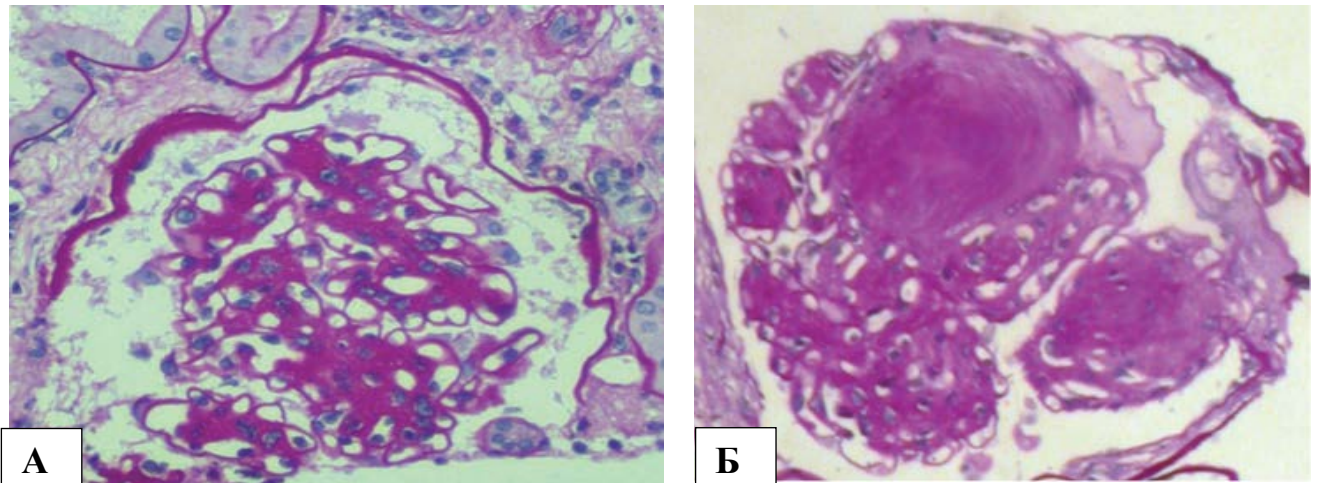


Рис. 3.8. Морфологічні зміни ниркового апарату при ДН на тлі ЦД 2-го типу:

А - дифузне розширення мезангія з невеликою супутньою мезангіальною проліферацією (забарвлення гематоксилін-еозином, $\times 200$); Б - нодулярний гломерулосклероз з утворенням вузликових структур (забарвлення гематоксилін-еозином, $\times 200$)

Морфологічне дослідження показало, що у групі тварин із ДН на тлі ЦД 2-го типу відмічалось зменшення розмірів ниркових тілець із дистрофічними зміненими клітинами зовнішньої та внутрішньої стінок капсули клубочка, вогнищеве стовщення БМ капілярів клубочка, розширення мезангія із формуванням долей, склерозування судинних петель із утворенням дольок та множинних синехій із склерозованим зовнішнім листком капсули. Епітелій звивистих каналців – в стані білкової дистрофії та атрофії, просвіт розширений, містить білкові циліндри. Дифузний склероз строми – із вогнищевими лімфоїдними інфільтрами. Виявлені гіаліноподобні маси між

капілярними петлями в клубочках нирок. Ці зміни отримали назву «інтеркапілярного гломерулосклерозу».

Отже, дані морфологічні зміни – дегенеративні за своєю природою, дають можливість припустити, що ЦД та атеросклероз є пусковими факторами в розвитку ДН та мають причинно- наслідковий зв'язок.

Висновки до розділу 3:

1. Встановлено, що у тварин із модельованим ЦД 2-го типу після одноразового введення стрептозотоцину дозою 65 мг/кг, відмічали достовірний приріст маси тіла, підвищення споживання води та рівня добового діурезу. Однак більш виражені зміни функціонального стану організму спостерігалися у групі щурів, які знаходили на високожировому раціоні харчування.

2. У щурів з ДН на тлі ЦД 2-го типу показники рівня глюкози плазми крові мали аналогічну тенденцію до підвищення як і в групі щурів з ЦД 2-го типу. Рівень глікозильованого гемоглобіну та холестерину мав тенденцію до підвищення. В експериментальних групах щурів спостерігалися наступні зміни співвідношення АпоВ-ЛП та ЛПВЩ: зростала концентрація АпоВ-ЛП та знижувалася ЛПВЩ, що свідчить про тенденцію до атеросклеротичного пошкодження судин різного калібру.

3. При експериментальному стрептозотоцинову діабеті та при мікросудинних ускладненнях на тлі ЦД відмічалися підвищення рівня виділення білка із сечею та кліренс креатиніну, незначні зміни клубочкової фільтрації та каналцевої реабсорбції. Однак як при ЦД 2-го типу, так і при ДН відмічали достовірні зміни процесів екскреції із сечею іонів натрію та калію, що пов'язано із зниження реабсорбції даних катіонів в каналцях нирок.

4. Морфологічне дослідження ниркового апарату дозволило встановити, що у групі тварин із ДН на тлі ЦД 2-го типу відмічалось зменшення розмірів ниркових тілець із дистрофічними зміненими клітинами зовнішньої та внутрішньої стінок капсули клубочка, вогнищеве стовщення БМ капілярів

клубочка, розширення мезангія, гіаліноподібні маси між капілярними петлями в клубочках нирок.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Study of the structural and functional state of kidneys in chronic hyperglycemia / Hrytsan I. I., Sarakhan V. M., Savytskyi I. V., Gerasymenko T. V., Savytskyi V. I., Mykhailuk M. M., Badiuk N. S. *Pharmacology Online*. 2021. Vol. 2. P. 788-795. (Особистий внесок – здобувач особисто провів дослідження, здійснив статистичний аналіз і узагальнення матеріалу).

РОЗДІЛ 4

КОМПЛЕКСНЕ ВИВЧЕННЯ ПОКАЗНИКІВ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ – ОДНІЄЇ ІЗ КЛЮЧОВИХ ЛАНОК ПАТОГЕНЕЗУ МІКРОСУДИННИХ УСКЛАДНЕНЬ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2-ГО ТИПУ

Відомо, що ЕД є одним із найбільш ранніх ознак ураження судин при ЦД та виявляється як на початкових стадіях захворювання, ще до появи атеросклеротичних бляшок, так і на пізніх етапах атеросклеротичного пошкодження, оскільки порушення ендотеліозалежної дилатації судин та підвищення адгезивності ендотеліальної вистилки можуть провокувати спазм, формування та ріст бляшки із наступним її розривом [59, 71].

Мікросудинні ускладнення на тлі ЦД 2-го типу реалізуються шляхом розвитку та прогресування ЕД про що свідчать зміни біохімічних маркерів (ендотелін-1, фактор фон Віллебранда та ін.) [78]. ЕД ниркових клубочків відображається на функціональній здатності нирок, на станові внутрішньо-ниркової гемодинаміки та проникності клубочкового фільтру. Дисрегуляція тонуусу висхідної та низхідної артеріол призводить до підвищення клубочкового кровотоку та розвитку гіпертонії [89, 93, 96].

Отже, оцінка ЕД при ЦД та мікроангіопатичних ускладненнях на тлі ЦД 2-го типу має комплексний та системний характер та базується на дослідженні маркерів пошкодження ендотелію, факторів ангіогенезу та регенерації ендотелію. Рання діагностика судинної системи, в тому числі і ДН буде сприяти розробці методів цілеспрямованої корекції ЕД та контролю адекватності проведеного лікування [92].

Тому наступним етапом нашого дослідження було вивчення маркерів ЕД у експериментальних тварин із модельованою ДН на тлі ЦД 2-го типу, а саме: змін рівня ендотеліну-1, фактора фон Віллебранда, індукцибельної NO-синтази та ендотеліальної NO-синтази.

4.1. Вивчення змін рівня ендотеліну-1 та фактора фон Віллебранда при діабетичній нефропатії на тлі цукрового діабету 2-го типу

Існуючі літературні дані щодо ролі ЕД в патогенезі хронічних ускладнень ЦД 2-го типу носять фрагментарний характер та стосуються впливу окремих факторів: гіперхолестеринемії, гіперглікемії, високого напруження гемодинамічного зсуву тощо [92].

Оскільки дані щодо впливу метаболічних та гемодинамічних факторів на функціональний стан ендотелію судин при ДН на тлі ЦД 2-го типу на сьогодні відсутні, доцільним було вивчення маркерів: вміст ендотеліну-1 та фактора фон Віллебранда в плазмі крові щурів експериментальних груп (рис. 4.1).

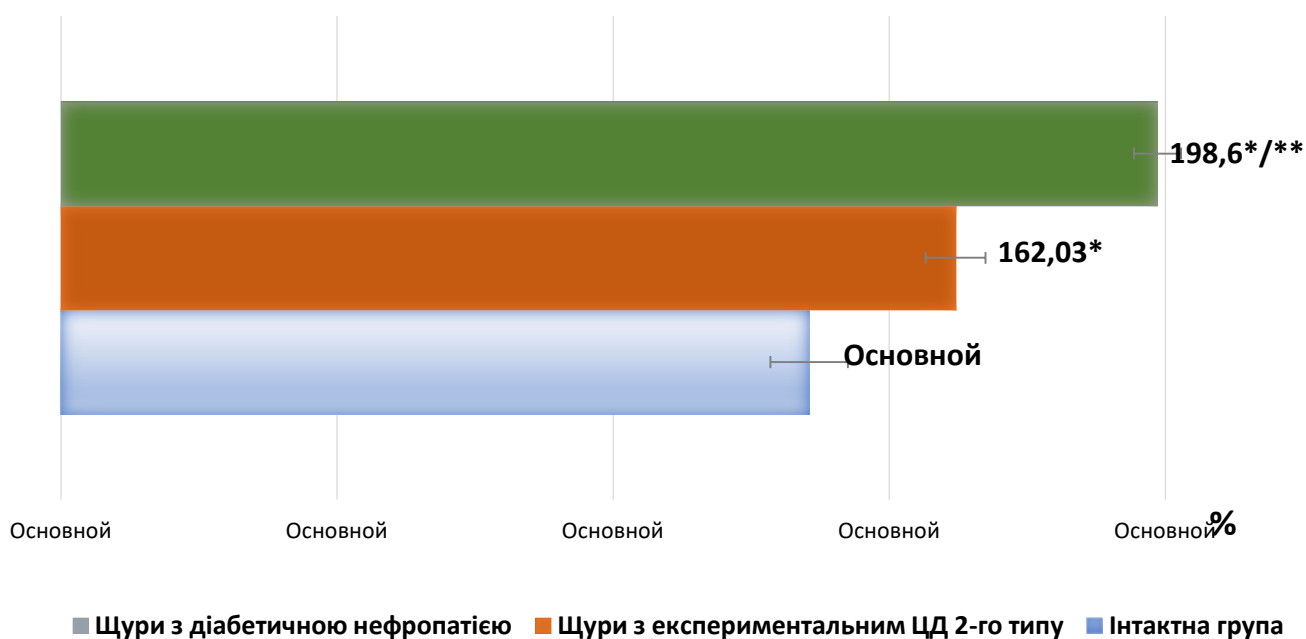


Рис. 4.1. Рівень фактора фон Віллебранда у щурів з мікроциркуляторними ускладненнями на фоні ЦД 2-го типу ($X \pm S_x$, $n=6$)

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ відносно показників інтактної групи тварин;
2. ** - $p < 0,05$ порівняно із групою тварин, яким моделювали ЦД 2-го типу.

В експериментальному дослідженні встановлено, що у групі щурів з експериментальним ЦД рівень фактора фон Віллебранда підвищувався в 1,2 рази ($p<0,05$), у тварин з ДН – в 1,5 разів ($p<0,05$) порівняно із групою інтактних тварин, що, ймовірно, обумовлено постійною дією агоністів на тромбоцити в результаті чого зменшується кількість гранул чи порушується реакція їх вивільнення та підвищується рівень досліджуваного фактора.

Одержані дані також можна пояснити тим, що при пошкодженні ендотелію внаслідок тривалої гіперглікемії велика кількість фактора фон Віллебранда зв'язується з компонентами субендотелію. Оскільки щільність і чутливість глікопротеїнових рецепторів тромбоцитів знижується, то знижується і активність фактора фон Віллебранда [68, 92, 93].

За сучасних умов профілактика та лікування мікросудинних ускладнень у пацієнтів, що страждають на ЦД 2-го типу, полягає у інтенсивному контролі за багатьма показниками, найважливішим із яких є функція ендотелію та вивчення рівня ендотеліну-1 [167, 209].

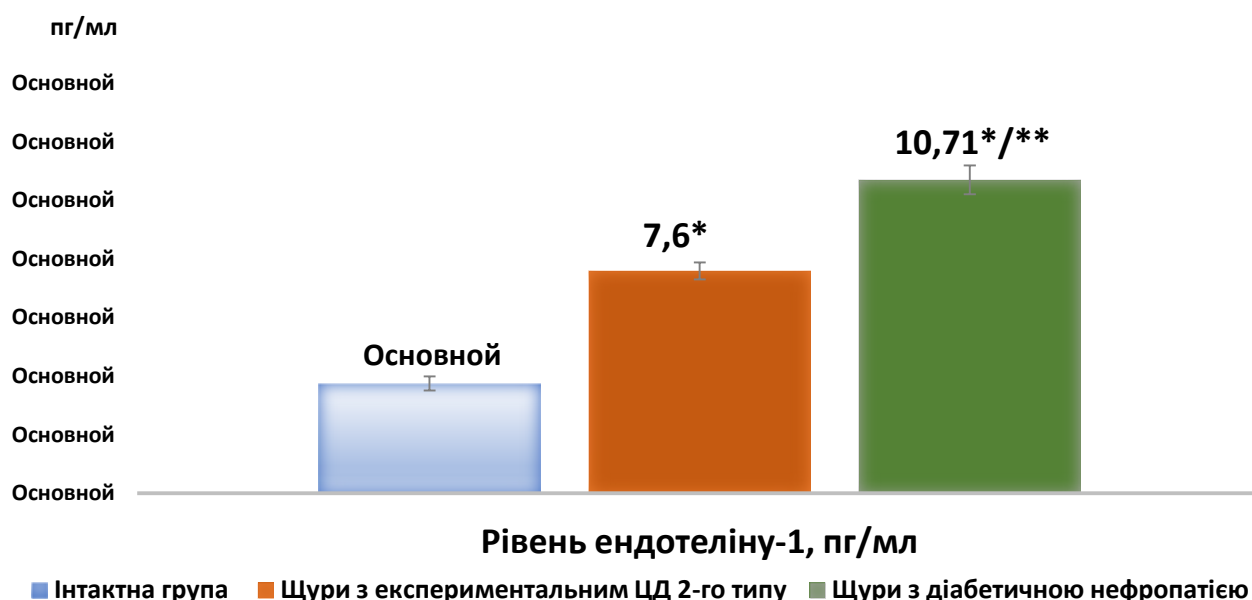


Рис. 4.2. Рівень ендотеліну-1 у щурів з мікроциркуляторними ускладненнями на фоні ЦД 2-го типу ($X \pm S_x$, $n=6$)

Примітки:

1. * - $p<0,05$ відносно показників інтактної групи тварин;

2. ** - $p < 0,05$ порівняно із групою тварин, яким моделювали ЦД 2-го типу.

При вивченні рівня ендотеліну-1 встановлено, що його рівень достовірно підвищувався у всіх досліджуваних групах щурів порівняно із інтактним контролем (рис. 4.2). У щурів з ЦД 2-го типу даний показник підвищувався в 2 рази ($p < 0,05$) порівняно із інтактною групою, а у щурів ДН даний показник перевищував результати інтактної групи тварин в 2,9 разів ($p < 0,05$).

Одержані дані пояснюються дисбалансом секреції ендотеліальних факторів, які відповідають за регуляцію тонусу судин, системи гемостазу, процеси міжклітинної взаємодії.

Таким чином, ЕД – інтегральний аспект синдрому інсулінорезистентності, що обумовлює підвищення реактивності судин, формування АГ та призводить до мікросудинних діабетичних ускладнень [92].

4.2. Оцінка біохімічних маркерів ендотеліальної дисфункції: індукцйбельної NO-синтази та ендотеліальної NO-синтази при діабетичній нефропатії

Враховуючи важливу роль порушення синтезу азоту у формуванні ЕД та отримавши експериментальні дані щодо змін рівня фактора фон Віллебранда (який продукується ендотелієм) доцільним було дослідження динаміки даних біохімічних маркерів (eNOS, так і iNOS) ЕД при ДН на тлі ЦД 2-го типу.

Розвиток цукрового діабету супроводжується змінами активності двох ключових ензимів обміну L-аргініну – iNOS та аргінази. У клітинах обмін L-аргініну відбувається окисним шляхом за участю NO-синтаз, внаслідок чого синтезуються нітрогену оксиду та L-цитрулін та неокисним – за допомогою аргінази, що забезпечує утворення орнітину та сечовини. Ці ензими конкурують між собою за субстрат та визначають пул L-аргініну у клітині [31, 82].

За умов цукрового діабету у тканині підшлункової залози відбувається

зростанням активності iNOS, внаслідок чого синтезуються велика кількість нітрогену оксиду, який при взаємодії з супероксидним радикалом утворює пероксинітрит, що викликає дисфункцію ендотеліоцитів, генотоксичний ефект на структуру ДНК, інгібує проліферацію лімфоцитів, знижує експресію антиапоптичних білків, інгібує функції багатьох ферментів [134].

Одержані дані представлені на рис. 4.3. Зокрема, рівень iNOS у щурів з експериментальним ЦД підвищувався в 4,2 рази ($p<0,05$), у тварин з ДН на тлі ЦД 2-го типу – в 5,0 разів ($p<0,05$) відносно щурів інтактної групи.

Рівень eNOS різко знижувався у щурів як з ЦД 2-го типу в 3,1 рази ($p<0,05$), так і у щурів з діабетичними ускладненнями – в 3,9 разів ($p<0,05$) відносно групи інтактного контролю.

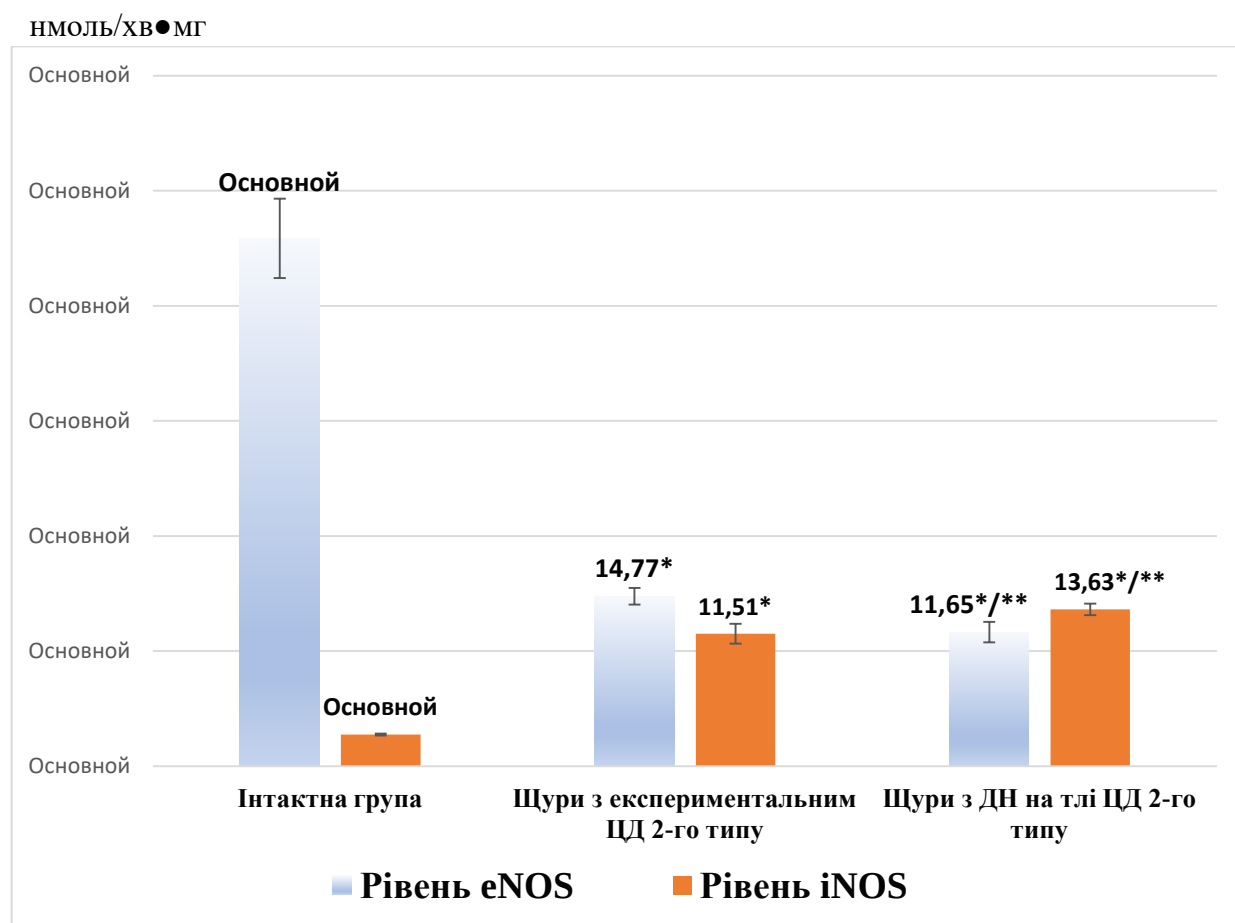


Рис. 4.3. Зміни рівня eNOS та iNOS у щурів з експериментальним ЦД 2-го типу та експериментальною діабетичною нефропатією

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ відносно показників інтактної групи тварин;
2. ** - $p < 0,05$ порівняно із групою тварин, яким моделювали ЦД 2-го типу.

Більш виражені зміни рівня як eNOS, так і iNOS відмічалися при пізніх діабетичних ускладненнях мікросудинного русла (ДН). Різде зниження рівня eNOS та компенсаторне підвищення iNOS (стимулюючий ефект може викликати γ -інтерферон, інтерлейкін-1 та інші цитокіни, рівень яких при ЦД підвищується) вказує на значні зміни ендотелію судин при експериментальному ЦД [138, 162, 202].

Оксид азоту є частиною багатокомпонентної системи регуляції судинного тонуусу. Тому при ЦД та наявності гіперглікемії, дисліпідемії, ОС та порушень цитокінового профілю дана система зазнає складних змін, що призводить до переважання вазоконстрикції та прогресування мікроангіопатичних ускладнень. В зв'язку з цим підвищений рівень оксиду азоту також може в певній мірі обумовлювати захисну дію проти вазоконстрикторних факторів (тромбоксан, ендотелін-1), продукція яких суттєво підвищується при мікроангіопатичних ускладненнях на тлі ЦД [129, 188, 193, 203].

Отже, при ЦД 2-го типу та його пізніх ускладненнях розгортається цілий каскад патологічних реакцій в ендотелії судин, які потерпають від глюкозотоксичності, надмірної дії стимулюючих гіпертензивних та запальних факторів, активаторів тромбоутворення, інтенсифікації ОС. Ймовірно, в розвитку ЕД найважливішими є наступні фактори: підвищений ОС та системна запальна реакція, деградація і проліферація глікокаліксу, порушення міжклітинних контактів ендотеліоцитів та гемато-тканинного бар'єру, посилення адгезії лейкоцитів та індукція прокоагулянтів і антифібринолітичних систем. Окрім цього, власне пошкоджений ендотелій судин включається в патогенез ЦД 2-го типу і обумовлює розвиток подальших ускладнень [23, 48, 139, 140, 141, 152, 168].

Висновки до розділу 4:

1. При вивченні показників, що характеризують ЕД (рівень ендотеліну-1 та фактора фон Віллебранда) встановлено, що порушення балансу регуляції тонусу судин, системи гемостазу та процесів міжклітинної взаємодії призводить до підвищення концентрації ендотеліну-1 та різкого підвищення викиду фактора фон Віллебранда. Одержані результати вказують на значні зміни ендотелію при мікросудинних ускладненнях на тлі ЦД 2-го типу.

2. Вивчення змін eNOS, так і iNOS дозволило встановити, що у щурів, яким відтворювали ДН на тлі ЦД 2-го типу спостерігалось різке зниження рівня eNOS та компенсаторне підвищення iNOS, що вказує на формування значних змін ендотелію судин при експериментальному ЦД.

3. Одержані експериментальних шляхом результати свідчать про те, що ЕД – однією із ключових ланок в патогенезі мікросудинних ускладнень, що виникають на тлі ЦД 2-го типу.

РОЗДІЛ 5

ДОСЛІДЖЕННЯ СПІВВІДНОШЕННЯ ПРОТИ- ПРОЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ПРИ ДІАБЕТИЧНІЙ НЕФРОПАТІЇ НА ТЛІ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2-ГО ТИПУ

Однією з характерних рис перебігу ЦД 2-го типу та його пізніх ускладнень є участь у процесах запалення прозапальних цитокінів, зокрема ІЛ-1 β , ІЛ-2, ІЛ-4 та гострофазових білків (СРБ, ФНП- α , фібриноген), які відіграють ключову роль у переході локального запалення до системного, що зумовлює тяжкий перебіг захворювання [33, 34, 41, 66, 100, 107, 144, 201].

Тому наступним етапом нашої роботи було вивчення змін рівнів проти- та прозапальних цитокінів, гострофазових показників плазми крові та системи АОЗ та ПОЛ при ЦД 2-го типу та при пізніх діабетичних ускладненнях.

5.1. Зміни рівнів проти- і прозапальних цитокінів у щурів з діабетичною нефропатією

Основою розвитку імунологічних реакцій є порушення цитокінового статусу, оскільки саме цитокіни безпосередньо беруть участь у розвитку запалення, імунної відповіді та процесах регенерації. Синтез цитокінів – медіаторів запальної реакції, досить короткостроковий процес. У зв'язку з цим складно вказувати на безпосереднє діагностичне значення концентрації окремих цитокінів при хронічних діабетичних ускладненнях, але не можна заперечувати діагностичного значення визначення співвідношення концентрації цитокінів – цитокінового профілю. Саме розбалансованість цитокінової регуляції та порушення рівноваги альтернативних за біохімічною активністю пулів молекул спричиняє розвиток патологічного процесу [33, 66, 100, 107, 144].

Зокрема, активація ФНП- α та його рецепторів викликає їх агрегацію, що призводить до утворення різних адапторних білків, які активують малоактивні кінази та протеази, включаючи каспази [155, 219].

Отже, враховуючи літературні дані щодо участі цитокінів в патогенезі багатьох захворювань, доцільним було вивчення їх участі в патогенезі мікроангіопатичних ускладнень (ДН) на тлі ЦД 2-го типу. З цією метою проводили визначення концентрацій про- та протизапальних цитокінів.

У результаті проведених експериментальних досліджень встановлено, що порушення цитокінового профілю були виразнішими у щурів, яким моделювали ДН на тлі ЦД-го типу, та характеризувалися підвищенням рівня прозапальних цитокінів (IL-1 β , IL-2) та менш суттєвим протизапальним IL-4, що вказує на переважання прозапальних властивостей крові над протизапальними.

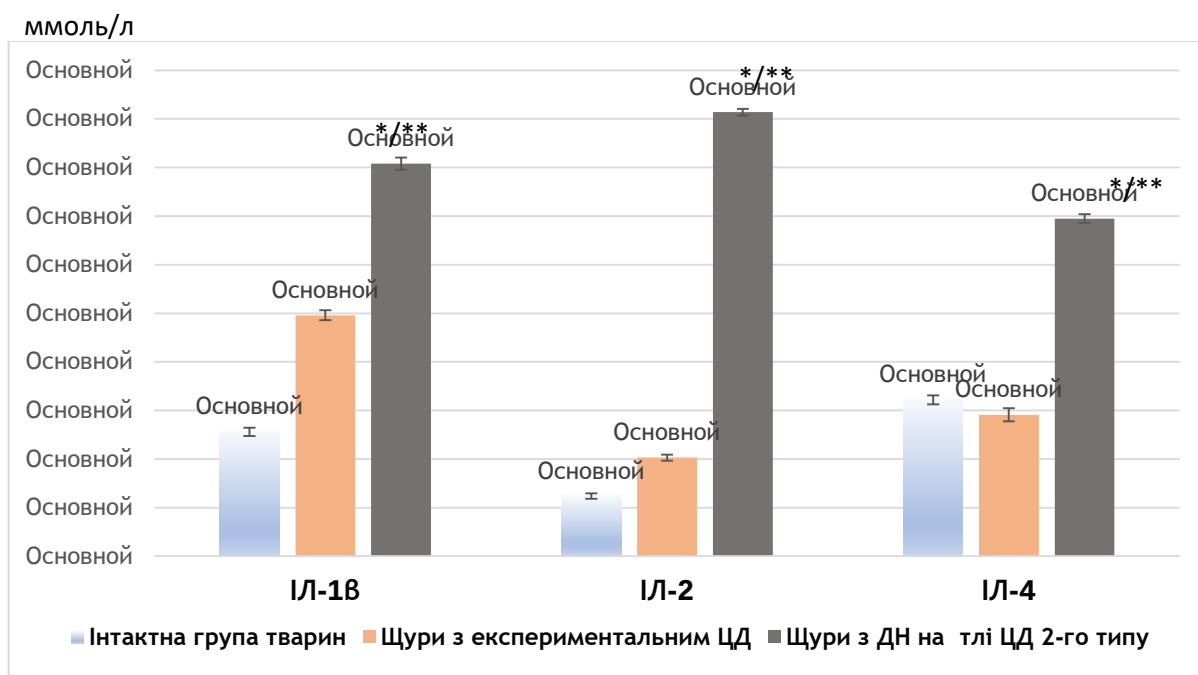


Рис. 5.1. Результати дослідження цитокінової ланки імунітету у щурів з експериментальним ЦД 2-го типу та експериментальною діабетичною нефропатією

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ відносно показників інтактної групи тварин;

2. ** - $p < 0,05$ порівняно із групою тварин, яким моделювали ЦД 2-го типу.

Вміст IL-1 β у щурів, яким моделювали ЦД 2-го типу перевищував аналогічний показник інтактних тварин в 1,9 разів ($p < 0,05$) та складав $49,6 \pm 1,02$ ммоль/л, в той час як у групі щурів з ДН – в 3,2 рази ($p < 0,05$) та дорівнював $80,8 \pm 1,23$ ммоль/л. Рівень IL-2, основна функція якого полягає в стимуляції специфічного клітинного імунітету, також достовірно підвищувався в 1,6 разів ($p < 0,05$) ($20,3 \pm 0,62$ ммоль/л) у щурів з ЦД 2-го типу та в 6,6 разів ($p < 0,05$) ($91,4 \pm 0,69$ ммоль/л) у тварин із ДН на тлі ЦД 2-го типу. Значне підвищення рівня IL-2 у щурів із ДН на тлі ЦД 2-го типу, головною функцією якого є стимуляція проліферації, насамперед Т-клітин. Ці зміни призводять до розвитку аутоімунного ушкодження органів-мішеней, забезпечуючи безперервність запального процесу з формування патологічного хибного кола.

Рівень IL-4 у щурів з ДН на тлі ЦД 2-го типу перевищував рівень інтактною групи тварин в 2,2 рази ($p < 0,05$), що можна пояснити значною вираженістю запального процесу за умов хронічної гіперглікемії на противагу тваринам із модельованим ЦД 2-го типу, в яких рівень IL-4 вірогідно не відрізнявся від групи інтактних тварин. Саме розбалансованість цитокінової регуляції та порушення рівноваги біологічно активних пулів молекул сприяє розвитку діабетичних ускладнень.

Активація прозапальних цитокінів, яким притаманна цитотоксична дія на ендотелій, посилює запальний процес, зумовлюючи осідання імунних комплексів на стінку судин, внаслідок чого посилюється прогресування ушкоджуючої дії на нирковий апарат. При цьому рівень IL-4 залишається на низькому рівні, що дає змогу прозапальним цитокінам стимулювати судинне запалення. Посилення судинного запалення, в свою чергу, призводить до масивної продукції IL-1 β , здатного викликати деструкцію β -клітин острівкового апарату підшлункової залози та призводити до інсулінової недостатності. Прозапальна група цитокінів є предиктором хронічних судинних ускладнень на тлі ЦД 2-го типу.

5.2. Вивчення рівня гострофазових білків у щурів з діабетичною нефропатією

На даному етапі дослідження спочатку ми вивчали рівень СРБ, оскільки він є одним із інтегральних маркерів прозапального стану, що використовується для оцінки ризику пізніх мікросудинних ускладнень. Доведено, що СРБ стимулює секрецію інших прозапальних цитокінів макрофагами, зокрема ІЛ-6 та ФНП- α , а також посилює експресію молекул адгезії клітинами ендотелію. Зазначені ефекти СРБ поряд із дисліпідемією представляють потужний механізм індукції атерогенезу [60, 80, 108, 115, 208].

Одержані дані щодо вивчення рівнів гострофазових білків при мікросудинних діабетичних ускладненнях представлені в таблиці 5.1 та на рисунку 5.2.

В результаті проведених досліджень встановлено, що ЦД 2-го типу супроводжується розвитком «яскравого» прозапального процесу, що підтверджується підвищенням концентрації СРБ в сироватці крові експериментальних тварин порівняно із інтактною групою тварин в 5,6 разів ($p < 0,05$). У щурів з ДН на тлі ЦД 2-го типу даний показник підвищувався в 6,5 разів ($p < 0,05$) порівняно із інтактною групою та в 1,2 рази ($p < 0,05$) відносно групи з експериментальним ЦД.

Таблиця 5.1

Рівень гострофазових білків сироватки крові щурів з експериментальним ЦД та ДН ($X \pm S_x$, $n=6$)

Показник	Інтактна група	Щури з ЦД 2-го типу	Щури з ДН на тлі ЦД 2-го типу
СРБ, мг/л	$3,28 \pm 0,49$	$18,22 \pm 1,29^*$	$21,42 \pm 2,21^{**/**}$
ФНП- α , пг/мл	$5,43 \pm 0,55$	$17,07 \pm 0,69^*$	$19,7 \pm 0,55^{**/**}$

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ відносно показників інтактної групи тварин;
2. ** - $p < 0,05$ порівняно із групою тварин, яким моделювали ЦД 2-го типу.

У групі щурів, яким моделювали ЦД 2-го типу спостерігалось достовірне підвищення рівня ФНП- α в 3,1 разів ($p < 0,05$), а у тварин з ДН – в 3,6 разів ($p < 0,05$) порівняно із інтактною групою щурів. При цьому даний показник був вірогідно вищим у щурів з мікросудинним ускладненням ниркового апарату ($19,7 \pm 0,55$ пг/мл) відносно тварин з ЦД 2-го типу ($17,07 \pm 0,69$ пг/мл).

Згідно літературних даних відомо, що ФНП- α є одним з ключових цитокінів, що бере участь у виникненні інсулінорезистентності і ЦД 2-го типу. Підвищений рівень ФНП- α індукує резистентність до інсуліну в адипоцитах і в периферичних тканинах, порушуючи передачу сигналів інсуліну. ФНП- α втручається також в ендотеліальний шлях передачі сигналів інсуліну і посилює інсулінорезистентність. Поряд з цим встановлено прямий взаємозв'язок між рівнем прозапальних цитокінів, включаючи ФНО- α , і концентрацією креатиніну в крові, а також тяжкістю хронічної ниркової недостатності. Підвищені рівні ФНП- α та інших прозапальних медіаторів сприяють зниженню швидкості клубочкової фільтрації і прогресуванню хронічної ниркової недостатності навіть з урахуванням впливу інших факторів. У нирках прозапальні цитокіни індукують експресію реактивних радикалів кисню, ліпідів і молекул адгезії, стимулюють патологічне накопичення матриксу і прокоагулянтну активність клітин ендотелію [155, 180, 218, 219].

Доведено, що фактор некрозу пухлин- α (ФНП- α) відіграє значну роль у виникненні та прогресуванні ЦД 2-го типу, беручи участь у розвитку імунної відповіді, діючи у трьох напрямках – цитотоксичному, імуномодулюючому і протизапальному, викликаючи активацію макрофагів, нейтрофілів, еозинофілів, ендотеліальних клітин, а також у розвитку гіперглікемії [32, 155, 156, 157, 158].

Згідно одержаних експериментальних даних, рівень фібриногену у щурів з експериментальним ЦД 2-го типу підвищувався в 1,5 разів ($p < 0,05$), в той час як у щурів з ДН даний показник зростав в 7,5 разів ($p < 0,05$) відносно показників інтактної групи.

Фібриноген як важливий маркер тромбозу та запалення безпосередньо пов'язаний з розвитком атеросклеротичних змін в інтимі судин і субклінічними проявами атеросклеротичного їх ураження. При ДН на тлі ЦД 2-го типу спостерігається виражена гіперфібриногенемія, що вказує не тільки на атеросклеротичне ураження ендотелію судин, а й свідчить про запуск каскаду гемокоагуляційних зсувів при мікроангіопатичних діабетичних ускладненнях.

Резистину притаманна здатність індукції гепатогенної інсулінорезистентності і стимуляції глюконеогенезу з гіперпродукцією глюкози печінкою. Рівень резистину в сироватці крові щурів з експериментальним ЦД 2-го типу підвищувався в 1,3 рази ($p<0,05$); у тварин з ДН на тлі ЦД 2-го типу – в 1,3 рази ($p<0,05$) порівняно із інтактними тваринами.

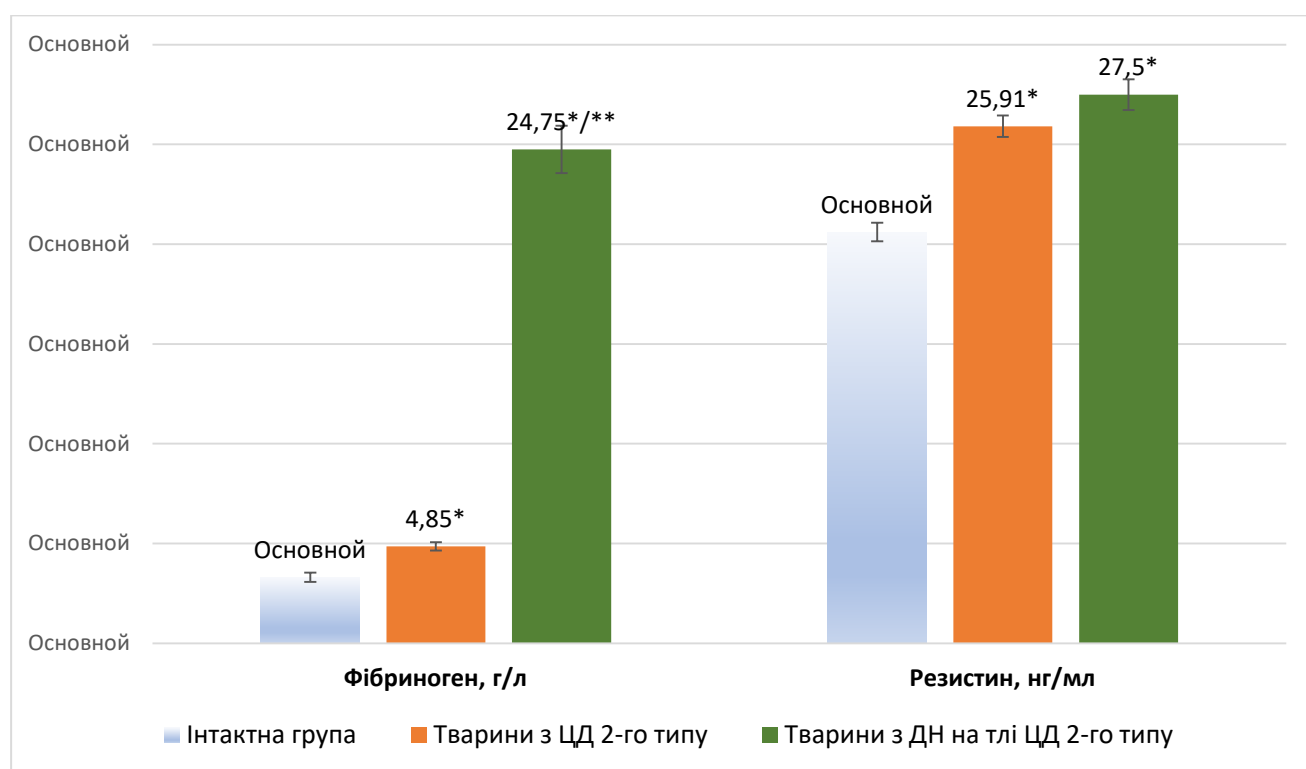


Рис. 5.2. Рівень фібриногену та резистину у щурів з експериментальним ЦД та ДН ($X \pm S_x$, $n=6$)

Примітки:

1. * - $p<0,05$ відносно показників інтактної групи тварин;
2. ** - $p<0,05$ порівняно із групою тварин, яким моделювали ЦД 2-го типу.

Таким чином, результати експериментального дослідження вказують на те, що у щурів при експериментальному стрептозотоциновому діабеті спостерігається значне підвищення рівнів гострофазових показників. У групі тварин з ДН на тлі ЦД 2-го типу відмічали більш виражені зміни досліджуваних показників.

5.3. Дослідження системи антиоксидантного захисту та перекисного окиснення ліпідів при діабетичній нефропатії на тлі цукрового діабету 2-го типу

ОС – це порушення в організмі балансу між прооксидантами та компонентами системи АОЗ. Він супроводжується різним ступенем вираженості дефіциту інсуліну та інсулінорезистентністю, що є однією із пускових та ключових патофізіологічних механізмів при ЦД, який призводить до розвитку судинних та органних порушень. Крім цього, ішемія, гіпоксія та псевдогіпоксія, що розвивається при ЦД, є додатковими предикторами, які сприяють підвищеному утворенню реактивних оксидантів в різних органах і тканинах [69].

За умов хронічної гіперглікемії, кисень, необхідний організму для нормального функціонування організму, стає водночас токсичною речовиною. В результаті розвиваються системні метаболічні розлади, характер та направленість яких дозволяє припустити, що одним із механізмів їх виникнення є підвищення інтенсивності вільно-радикального окиснення мембранних фосфоліпідів, що призводить до накопичення токсичних продуктів, окисної деструкції ліпідів, порушення функціональної здатності мембранних структур до відповідних змін клітинного метаболізму [65].

Наступним етапом нашої роботи було вивчення АОЗ та ПОЛ при мікросудинному ураженні ниркового апарату на тлі ЦД 2-го.

Підвищений рівень ДК поряд із збільшенням вільнорадикальної активності є одним із факторів, що бере участь в механізмі мікроангіопатій на

тлі ЦД. У щурів з експериментальним ЦД 2-го типу спостерігалось достовірне підвищення рівня ДК в 1,4 рази ($p<0,05$), а в групі тварин з ДН на тлі ЦД 2-го типу – в 1,8 разів ($p<0,05$) порівняно з інтактною групою, що свідчило про окисне ушкодження ліпідів мембран гепатоцитів, оскільки вищезазначені сполуки є проміжними та кінцевими продуктами ПОЛ відповідно (рис. 5.3, рис. 5.4).

Вміст ТБК-АП у групі тварин із експериментальним ЦД 2-го типу підвищувався в 1,8 разів ($p<0,05$) порівняно з тваринами інтактного контролю. У тварин з ДН на тлі ЦД 2-го типу даний показник підвищувався в 2 рази ($p<0,05$) порівняно з інтактними тваринами.

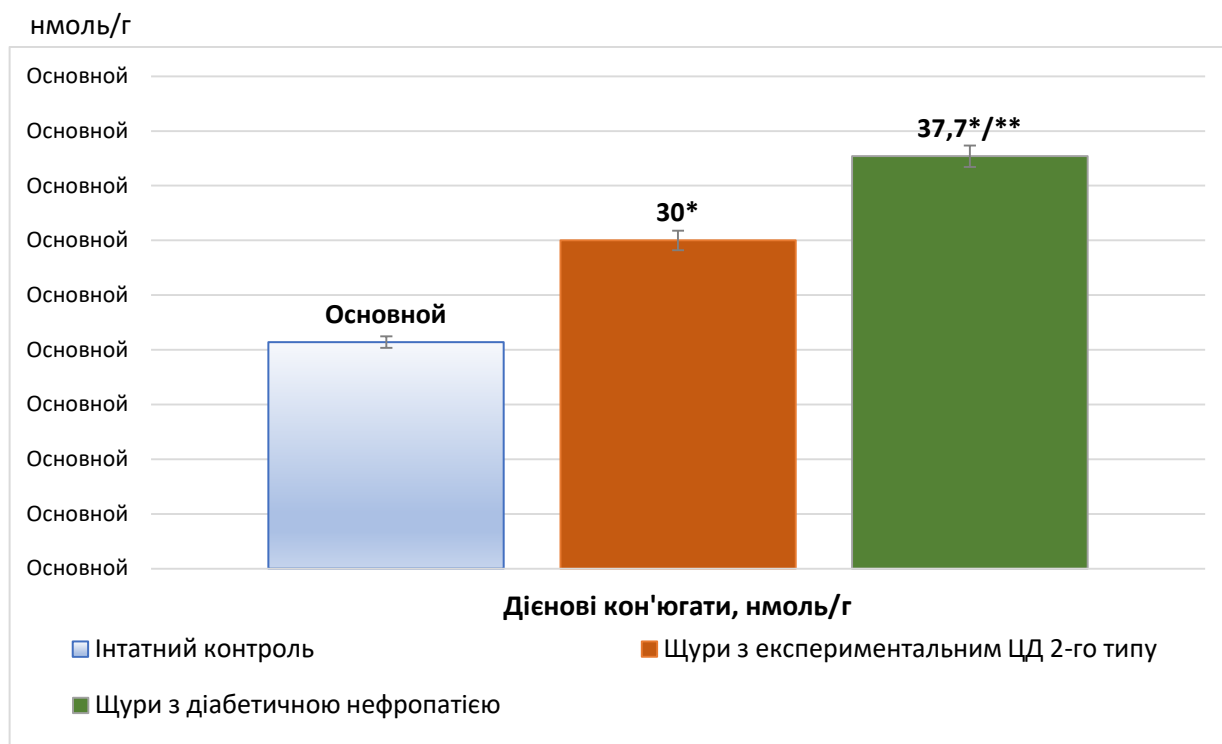


Рис. 5.3. Рівень ДК у щурів з мікросудинними ускладненнями на тлі ЦД 2-го типу

Примітки:

1. * - $p<0,05$ відносно показників інтактної групи тварин;
2. ** - $p<0,05$ порівняно із групою тварин, яким моделювали ЦД 2-го типу.

Розвиток ЦД 2-го типу корелював із виснаженням АОЗ: спостерігалось зниження вмісту ВГ у 1,7 разів ($p<0,05$) у тварин з ЦД 2 типу; в 2,6 разів

($p < 0,05$) у тварин з ДН на тлі ЦД 2-го типу відносно групи інтактних тварин.

Центральним компонентом АОС є ВГ – основний сірковмісний антиоксидант функціональної АОЗ, який захищає сульфгідрильні групи глобіну, мембрани еритроцитів, двовалентне залізо від дії окиснювачів.

На наступному етапі нашого дослідження ми вивчали стан ПОЛ за концентрацією МДА та каталази (табл. 5.2).

МДА – кінцевий продукт ПОЛ, сприяє агрегації тромбоцитів та тромбоутворенню. Оскільки МДА інгібує простагліцик, з підвищенням його рівня збільшується синтез тромбоксанів, які сприяють адгезії тромбоцитів до клітин ендотелію, що, в свою чергу, порушує мікроциркуляцію та ініціює атероматозний процес.

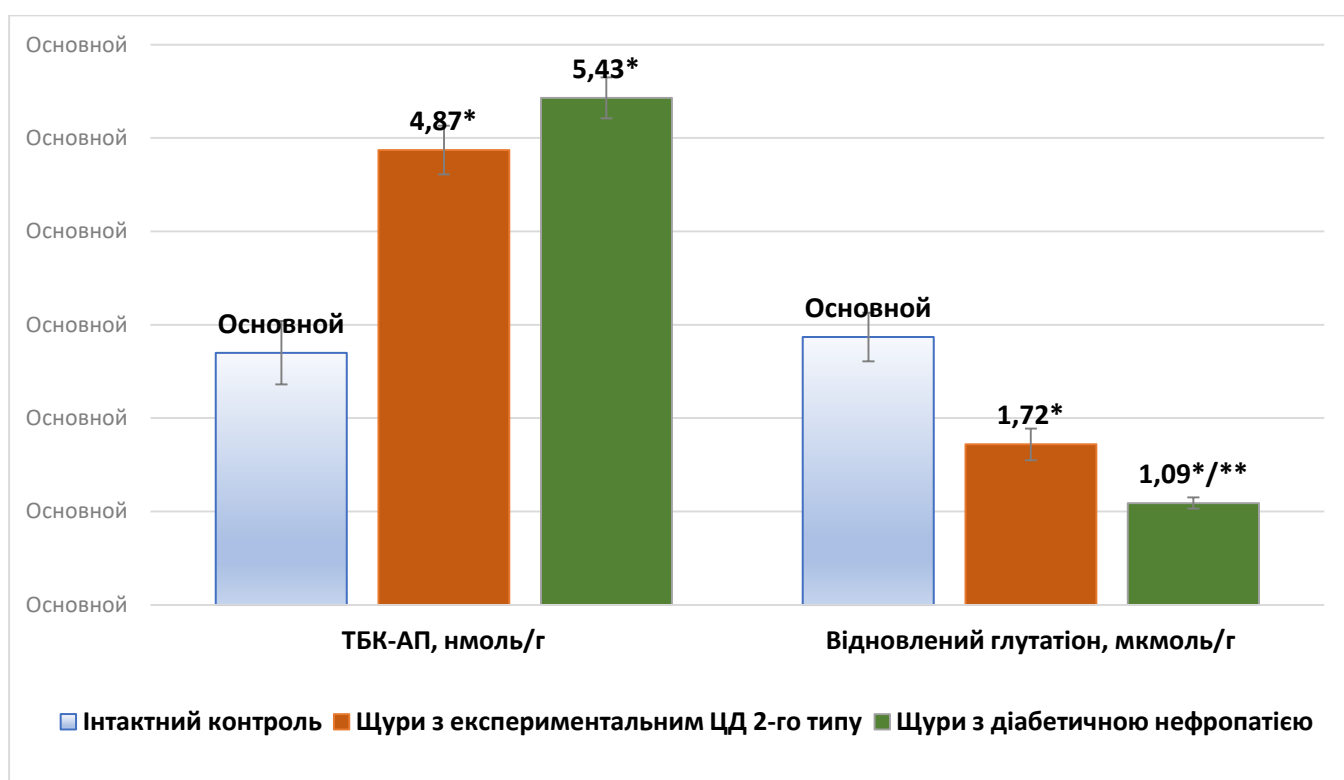


Рис. 5.4. Рівень ТБК-АП та ВГ у щурів з мікросудинними ускладненнями на тлі ЦД 2-го типу

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ відносно показників інтактної групи тварин;
2. ** - $p < 0,05$ порівняно із групою тварин, яким моделювали ЦД 2-го типу.

Внаслідок зміни оксигенації клітин та утворення активних форм кисню, відбуваються зміни якісного складу фосфоліпідів, порушення аеробних окисних процесів в тканинах, підвищення рівня лактату в крові та зниження рН клітин. Переключення аеробних процесів окиснення глюкози на анаеробний стимулює процеси ліполізу та порушує утилізацію вільних жирних кислот за умов гіпоксії. Накопичення вільних жирних кислот із їх детергентною дією активує ПОЛ, що може призвести до пошкодження мембрани та зниження енергоутворення в клітині. Продукти ПОЛ відносять до токсичних метаболітів, які обумовлюють пошкоджуючу дію на ліпопротеїди, білки, ферменти та нуклеїнові кислоти [65].

У групах експериментальних тварин спостерігалось підвищення рівня МДА, що вказувало на активацію системи вільно-радикального окиснення. Зокрема, в групі тварин з ЦД 2-го типу вміст МДА підвищувався в 3,2 разів ($p<0,05$); у тварин з ДН на тлі ЦД 2-го типу – в 3,9 рази ($p<0,05$) відносно аналогічного показника у групі тварин інтактного контролю.

Вміст каталази у щурів з ЦД 2-го типу знижувався в 1,3 рази ($p<0,05$); у тварин з ДН на тлі ЦД 2-го типу – в 2,05 разів ($p<0,05$) порівняно із групою інтактних тварин.

Таблиця 5.2

Показники ПОЛ при мікроангіопатичних ускладненнях на тлі ЦД 2-го типу

($X \pm Sx$, $n=6$)

Показник	Інтактний контроль	Тварини з експериментальним ЦД 2-го типу	Тварини з експериментальною ДН на тлі ЦД 2-го типу
МДА, мкмоль/л	$4,6 \pm 0,31$	$14,75 \pm 0,53^*$	$18,02 \pm 0,41^{**/*}$
Каталаза, ммоль/л	$0,41 \pm 0,04$	$0,31 \pm 0,06$	$0,2 \pm 0,03^*$

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ відносно показників інтактної групи тварин;
2. ** - $p < 0,05$ порівняно із групою тварин, яким моделювали ЦД 2-го типу.

Варто відмітити тенденцію до більш вираженого ОС у щурів із діабетичними мікросудинними ускладненнями ЦД 2-го типу, яку можна пояснити тим, що окрім гіперглікемії у даних тварин надлишкове утворення вільних радикалів сприяє метаболічним зсувам в ішемізованих зонах тканин та органів.

Таким чином можна зробити висновок, що надлишкова генерація вільних радикалів призводить до розвитку ЕД, модифікації ліпопротеїнів та розладів системи гемокоагуляції. Порушення балансу в АОЗ та ПОЛ при ЦД 2-го типу запускає патогенетичний каскад розвитку ускладнень мікроциркуляторного русла та супроводжується тенденцією до ще більшого посилення генерації активних форм кисню і активації ПОЛ. Постійний фон порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в організмі при ЦД є однією із причин інсулінорезистентності та загибелі β -клітин підшлункової залози та структурно-функціональних одиниць інших органів, що обумовлює розвиток поліорганної недостатності.

5.4. Визначення активності ферментної системи глутатіону в еритроцитах

Активація вільнорадикального окиснення ліпідів та білків є обов'язковим компонентом клітинної відповіді на дію стресорних факторів. Головним елементом такої відповіді є зміна активності системи АОЗ [56].

При моделюванні ЦД 2-го типу та ДН активізувалися процеси ПОЛ та порушувався антиоксидантний захист еритроцитів. Система АОЗ включає «непряму» та «пряму» складові. Непряма складова АОЗ оптимізує

функціонування базового метаболізму, який не передбачає генерацію надмірної кількості продуктів ліпопероксидації та АФК. Об'єктивним способом регулювання киснево-перекисного стану та залежних сигнальних шляхів, що визначають протікання всіх фундаментальних клітинних процесів, є зміна «мітохондріальної бази», яка включає в себе активність, а також кількісні та якісні складові мітохондрій. Пряма складова АОЗ – комплекс низько- та макромолекулярних сполук ендogenousного походження.

Ключову роль в системі АОЗ відіграють антиоксидантні ферменти – фактори першої лінії захисту від продуктів вільнорадикального окиснення та ліпопероксидації, до яких відносять комплекс ферментів системи функціонування глутатіону (глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон- S-трансфераза) [40, 52].

Метаболічні показники змінювалися порівняно з групою інтактних тварин (табл.5.3). Такі зміни активності ферментів еритроцитів можуть бути зумовлені їх модифікацією з активним киснем і глюкозою. Від концентрації глюкози в крові залежить ступінь неферментативного глікозилювання білків, яке приводить до їхньої ковалентної модифікації і зміни структурно-функціональних особливостей.

Таблиця 5.3

Активність антиоксидантних ферментів в еритроцитах у щурів
експериментальних груп ($X \pm S_x$, $n=6$)

Показник	Інтактна група	Щури з ЦД 2-го типу	Щури з ДН на тлі ЦД 2-го типу
Глутатіонпероксидаза, ммоль/хв*л	583 $\pm$ 7,75	349,6 $\pm$ 7,61*	403,17 $\pm$ 5,27*/**
Глутатіонредуктаза, ммоль/хв*л	0,46 $\pm$ 0,06	0,3 $\pm$ 0,05*	0,19 $\pm$ 0,03*/**
Глутатіон-S-трансфераза,	1,27 $\pm$ 0,05	0,87 $\pm$ 0,06*	0,72 $\pm$ 0,04*/**

ММОЛЬ/ХВ*Л			
------------	--	--	--

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ відносно показників інтактної групи тварин;
2. ** - $p < 0,05$ порівняно із групою тварин, яким моделювали ЦД 2-го типу.

Одержані результати вказують на те, що при ДН на тлі ЦД 2-го типу спостерігаються більш виражені зміни АОЗ еритроцитів.

Зокрема, рівень глутатіонпероксидази у щурів з експериментальним ЦД 2-го типу достовірно знижувався в 1,7 разів, а у тварин з ДН – в 1,4 рази порівняно із групою інтактного контролю. Також відмічалось зниження рівня глутатіонредуктази: в 1,5 разів у щурів з ЦД 2-го типу та в 2,4 у щурів з ДН порівняно із аналогічним показником у групі інтактних тварин. Показник глутатіон-S-трансфераза достовірно знижувався в 1,5 разів у групі тварин із модельованим ЦД 2-го типу та в 1,8 разів у щурів з ДН.

Отже, одним із предикторів розвитку ЦД 2-го типу, так і мікроангіопатичних уражень на тлі ЦД 2-го типу (зокрема, ДН) є порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги. Встановлено, що за умов тривалої гіперглікемії спостерігається підвищення рівня ДК, ТБК-АП з одночасним зниженням МДА, ВГ та активності антиоксидантних ферментів еритроцитів.

Висновки до розділу 5:

1. У результаті проведених експериментальних досліджень встановлено, що порушення цитокінового профілю були виразнішими у щурів, яким моделювали ДН на тлі ЦД-го типу, та характеризувалися підвищенням рівня прозапальних цитокінів (IL-1 β , IL-2) та менш суттєвим протизапальним IL-4, що вказує на переважання прозапальних властивостей крові над протизапальними. Саме розбалансованість цитокінової регуляції та порушення

рівноваги біологічно активних пулів молекул сприяє розвитку діабетичних ускладнень.

2. В результаті проведених досліджень встановлено, що ЦД 2-го типу супроводжується розвитком «яскравого» прозапального процесу, що підтверджується підвищенням концентрації СРБ, ФНП- α , фібриногену та резистину в сироватці крові експериментальних тварин порівняно із інтактною групою тварин.

3. При вивченні системи АОЗ та ПОЛ спостерігалось достовірне підвищення рівня ДК та ТБК-АП у групі тварин як з експериментальним ЦД 2-го типу, так і у тварин з ДН. Розвиток ЦД 2-го типу корелював із виснаженням АОЗ: спостерігалось зниження вмісту ВГ у 1,7 разів ($p < 0,05$) у тварин з ЦД 2 типу; в 2,6 разів ($p < 0,05$) у тварин з ДН на тлі ЦД 2-го типу відносно групи інтактних тварин. Відмічалось підвищення рівня МДА та зниження рівня каталази, що вказувало на активацію системи вільно-радикального окиснення при моделюванні ЦД 2-го типу та мікросудинних ускладнень.

3. Одержані результати щодо активності антиоксидантних ферментів в еритроцитах у щурів з ЦД та ДН на тлі ЦД 2-го типу вказують на достовірне зниження рівня глутатонредуктази в 1,5 разів у щурів з ЦД 2-го типу та в 2,4 у щурів з ДН порівняно із аналогічним показником у групі інтактних тварин. Показник глутатіон-S-трансфераза достовірно знижувався в 1,5 разів у групі тварин із модельованим ЦД 2-го типу та в 1,8 разів у щурів з ДН.

4. Таким чином, одним із ключових ланок в розвитку ЦД 2-го типу та мікроангіопатичних уражень на тлі ЦД 2-го типу є порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги за рахунок підвищення рівня ДК, ТБК-АП з одночасним зниженням МДА, ВГ та активності антиоксидантних ферментів еритроцитів.

РОЗДІЛ 6

ДОЦІЛЬНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ БІОФЛАВОНОЇДІВ ТА L-АРГІНІНУ З МЕТОЮ ПАТОГЕНЕТИЧНОЇ КОРЕКЦІЇ ДІАБЕТИЧНОЇ НЕФРОПАТІЇ

Одним із найважливіших аспектів в терапії ЦД є ліквідація симптомів, оптимальний метаболічний контроль, профілактика гострих і хронічних ускладнень, досягнення більш високої якості життя і економічна доступність для пацієнтів. На сьогодні відомо три патогенетичних варіанти лікування ЦД, які знайшли широке впровадження в практичну медицину: замісна терапія інсуліном; замісна терапія оральними антидіабетичними препаратами та лікарськими засобами, що знижують активність контрінсулярних позапанкреатичних факторів [22, 53, 133, 163, 164, 187].

Однак навіть правильно обраний патогенетичний варіант лікування не завжди запобігає розвитку ускладнень, особливо пізніх. Варто відзначити те, що побічними ефектами інсулінотерапії при ЦД 2-го типу є: збільшення ваги, відчуття голоду, затримка рідини і натрію, гіпоглікемія, розвиток алергічних реакцій, що істотно обмежує призначення цукрознижувальних препаратів хворим ЦД та обґрунтовує доцільність розробки та впровадження інших видів терапії. Одним із перспективних напрямків вирішення даного завдання є використання в комплексній терапії лікарських засобів природного походження [36, 38, 81, 181]. Серед переваг застосування фітотерапії в реабілітації хворих на ЦД та його ускладнення слід відзначити відсутність різких коливань рівня глюкози в крові; відсутність інших побічних ефектів з боку внутрішніх органів та позитивний вплив на вуглеводний обмін [106].

Саме тому доцільним було дослідження ефективності біофлавоноїдів в комплексі з L-аргініном на різні патогенетичні ланки діабетичних ускладнень мікросудинного русла як додаткового методу профілактики та лікування хронічних ангіопатій на тлі ЦД 2-го типу. Вивчення впливу даної патогенетичної схеми на розвиток ДН проводили з урахуванням введення щурам метформіну дозою 60 мг/кг.

Дослідження показників, що характеризують ендотеліальну дисфункцію, антиоксидантний захист та систему ПОЛ, активність ферментної системи еритроцитів проводили на 15 та 30 добу експерименту від початку введення досліджуваних компонентів.

6.1 Вплив досліджуваної терапії біофлавоноїдів у комплексі з L-аргініном на загальний стан тварин та біохімічні показники

На першому етапі вивчення впливу як додаткової терапії біофлавоноїдів та L-аргініну нами було проведено дослідження маси тіла експериментальних тварин, вживання води, добовий діурез та концентрації глюкози в плазмі крові.

На 6-му тижні експерименту приріст маси тіла у щурів з ДН на тлі ЦД 2-го типу складав 34 % ($377,4 \pm 10,1$ г) (рис. 6.1).

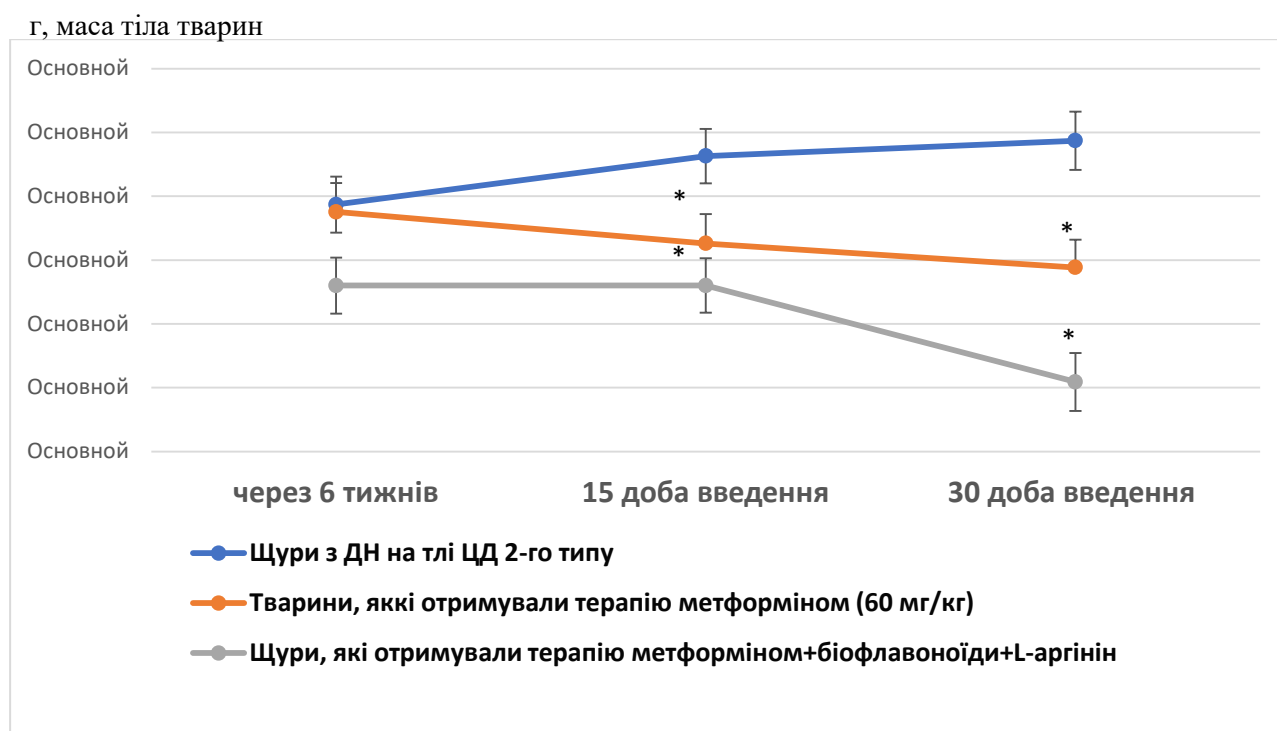


Рис. 6.1. Динаміка маси тіла щурів з урахування проведеної терапії

Примітка. * - $p < 0,05$ порівняно із групою контрольної патології.

Встановлено, що через 15 діб введення біофлавоноїдів та L-аргініну на тлі застосування метформіну (60 мг/кг) маса тварин з експериментальним ДН на

тлі ЦД 2-го типу вірогідно не змінювалася, однак на 30 добу спостереження показник починав знижуватися. Так, у групі тварин, які отримували метформін маса тіла тварин складала $365,4 \pm 9,25$ г (в той час, як у групі контрольної патології даний показник дорівнював $377,4 \pm 8,78$ г); у експериментальних тварин, яким вводили метформін, біофлавоноїди та L-аргінін протягом 15 діб маса тіла складала $352 \pm 11,8$ г, а на 30 добу – $321,8 \pm 7,45$ г ($p < 0,05$).

Отже, можна зробити висновок, що введення додаткової терапії на тлі застосування метформіну (в його ефективній дозі 60 мг/кг) призводить до незначного зниження маси тіла експериментальних тварин, що, ймовірно, обумовлено, впливом антиоксидантів на певні ланки патогенезу мікросудинних ускладнень.

По мірі зниження середньої маси тіла тварин на тлі введення біофлавоноїдів та L-аргініну реєструвалося поступове зниження добового споживання води: у групі тварин, які отримували метформін, біофлавоноїди та L-аргініном протягом 15 діб даний показник знижувався в 1,2 рази ($22,4 \pm 2,6$ мл, в той час як у групі тварин з ДН даний показник дорівнював $26,9 \pm 4,1$ мл).

На 30-у добу спостереження у експериментальних тварин, які отримували додаткову терапію біофлавоноїдів та L-аргініну добове споживання води знижувалося в 1,5 разів порівняно із групою контрольної патології.

Також було встановлено зниження добового діурезу: на 6-му тижні спостереження у щурів з ДН на тлі ЦД 2-го типу даний показник складав $62,4 \pm 5,2$ мл. При введенні метформіну, біофлавоноїдів та L-аргініну протягом 15 діб спостерігалось зниження рівня добового діурезу в 1,4 рази ($44,6 \pm 3,1$ мл), а на 30 добу даний показник складав $38,4 \pm 14,8$ мл ($p < 0,05$).

Одержані дані свідчать про те, що введення експериментальним тваринам в якості додаткової терапії біофлавоноїдів та L-аргініну на тлі застосування цукрознижувальних препаратів призводить до відновлення функціонального стану організму, а саме зниження маси тіла, зниження споживання води та рівня добового діурезу.

При дослідженні рівня глюкози на тлі застосування метформіну (60 мг/кг) встановлено його зниження в 1,8 разів (на 30 добу) ($p < 0,05$), при введенні додаткової терапії біофлавоноїдів та L-аргініну (на тлі застосування метформіну) протягом 15 діб встановлено його достовірне зниження в 2,1 рази ($p < 0,05$) порівняно із показниками групи контрольної патології. На 30 добу даний показник знижувався в 2,5 разів ($p < 0,05$). Дана тенденція, ймовірно, обумовлена не лише гіпоглікемічною дією метформіну (60 мг/кг), але й зумовлена наявністю в складі біофлавоноїдів простих фенолів, поліфенолів, які інгібують глюкозо-6- фосфатазу, що каталізує кінцевий етап глікогенолізу та глюконеогенезу; флавоноїдів, які поліпшують мікроциркуляцію тканин за рахунок мембраностабілізуючої та антиоксидантної дії й покращують метаболізм інсулінозалежних процесів. Крім цього, знизити рівень цукру в крові біофлавоноїди можуть за допомогою різних механізмів, у тому числі гальмуванням всмоктування глюкози в кишечнику або збільшенням її поглинання периферичними тканинами.

Очевидно, що терапія антиоксидантами може бути корисною допоміжною терапією до традиційного лікування цукрознижуючими препаратами.

Разом із зниженням рівня глюкози, спостерігалася зміна основного показника оцінки компенсації ЦД та верифікації ризику розвитку мікро- та макросудинних ускладнень – глікозильованого гемоглобіну, оскільки, підвищення його рівня асоційоване з підвищенням ризику розвитку пізніх ускладнень як у хворих ЦД 1-го типу, так і ЦД 2-го типу.

У групі тварин, які отримували метформін (60 мг/кг) протягом 30 діб рівень глікозильованого гемоглобіну знижувався в 1,4 рази ($p < 0,05$); у тварин, яким вводили метформін, біофлавоноїди та L-аргінін протягом 15 діб даний показник знижувався в 1,8 разів ($p < 0,05$), а у експериментальних тварин, які отримували аналогічну терапію протягом 30 діб – в 2,5 разів ($p < 0,05$).

Оскільки біофлавоноїди є потужними інгібіторами окиснення ЛПНЩ, підвищення утворення яких вважається одним з ключових механізмів у

розвитку атеросклерозу, та стимуляторами синтезу ЛПВЩ, нами було досліджено вплив додаткової терапії біофлавоноїдів та L-аргініну на співвідношення АпоВ-ЛП та ЛПВЩ, що свідчить про тенденцію до атеросклеротичного пошкодження судин різного калібру (табл. 6.1).

Одержані дані дозволяють свідчити, що введення протягом 30 діб в якості додаткової терапії біофлавоноїдів та L-аргініну призводить до врівноваження ліпідного обміну, безпосередньо за рахунок зниження співвідношення АпоВ-ЛП та підвищення ЛПВЩ. На 15 добу спостереження також встановлено достовірне врівноваження біохімічних показників крові, зокрема, співвідношення АпоВ-ЛП знижувалося в 1,2 рази ($p < 0,05$) порівняно із групою контрольної патології, а рівень ЛПВЩ зріс в 1,4 рази ($p < 0,05$).

Таблиця 6.1

Зміни біохімічних показників крові щурів при застосування додаткової антиоксидантної терапії в комплексі з L-аргініном ($\bar{X} \pm S_x$, $n=20$)

Експериментальні групи	Холестерин	АпоВ-ЛП, %	ЛПВЩ, %
Щури з ДН	$2,94 \pm 0,04$	$37,8 \pm 3,5$	$7,12 \pm 0,35$
Тварини, які отримували метформін (60 мг/кг) (30 діб)	$2,75 \pm 0,07$	$34,8 \pm 3,72$	$8,02 \pm 0,48$
Тварини, які отримували метформін+ біофлавоноїди+ L-аргінін (15 діб)	$2,54 \pm 0,06$	$31,6 \pm 2,82^*$	$9,7 \pm 1,3^*$
Тварини, які отримували метформін+ біофлавоноїди+ L-аргінін (30 діб)	$2,38 \pm 0,05^{**/**}$	$28,4 \pm 2,45^{**/**}$	$11,4 \pm 1,4^{**/**}$

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ відносно показників групи тварин з ДН;
2. ** - $p < 0,05$ порівняно із групою тварин, яким вводили метформін

протягом 30 діб.

Отже, проведена додаткова терапія біофлавоноїдів в комплексі з L-аргініном вже на 15 добу сприяє нормалізації маси тіла експериментальних щурів, зниженню рівня глюкози сироватки крові та врівноваженню ліпідного обміну за рахунок зниження співвідношення АпоВ-ЛП та підвищення ЛПВЩ.

6.2. Оцінка можливостей проведеної терапії в корекції ендотеліальної дисфункції у щурів з діабетичною нефропатією

Ендотелій – не просто напівпроникна мембрана, що вистилає внутрішню поверхню серця і судин, а дифузно розсіяний по всіх тканинах активний ендокринний орган. Однією з основних функцій ендотелію є збалансоване виділення регуляторних субстанцій, що визначають цілісну роботу системи кровообігу. NO присутній у всіх ендотеліальних клітинах незалежно від розміру та функції судин. У нормально функціонуючому ендотелію низькі рівні NO постійно вивільняються для підтримки кровоносних судин в стані дилатації і забезпечення неадгезивності ендотелію по відношенню до формених елементів крові [93, 140, 141].

Використання L-аргініну – однієї із найбільш універсальних метаболічних амінокислот та важливим компонентом обмінних процесів підтримки оптимального азотного балансу в організмі, так як є попередником NO та приймає участь у транспортуванні і знешкодженні надлишкового NO в організмі є доцільний в комплексній терапії ЦД 2-го типу та його ускладнень, оскільки чинить виражену ендотелійпротектну дію.

Тому наступним етапом нашого дослідження було вивчення впливу біофлавоноїдів та L-аргініну на стан ЕД.

Аналіз одержаних результатів дозволив встановити, що введення біофлавоноїдів та L-аргініну протягом 30 діб на фоні застосування метформіну

призводило до достовірних змін показників, що характеризують ЕД (ендотеліну-1 та фактор фон Віллебранда) (рис. 6.2, рис. 6.3).

Зокрема, у групі тварин, яким вводили метформін достовірних змін рівня ендотеліну-1 не спостерігали. Введення в якості додаткової терапії біофлавоноїдів та L-аргініну протягом 15 діб призводило до зниження рівня ендотеліну-1 в 1,1 рази ($p < 0,05$) відносно показників групи тварин з ДН.

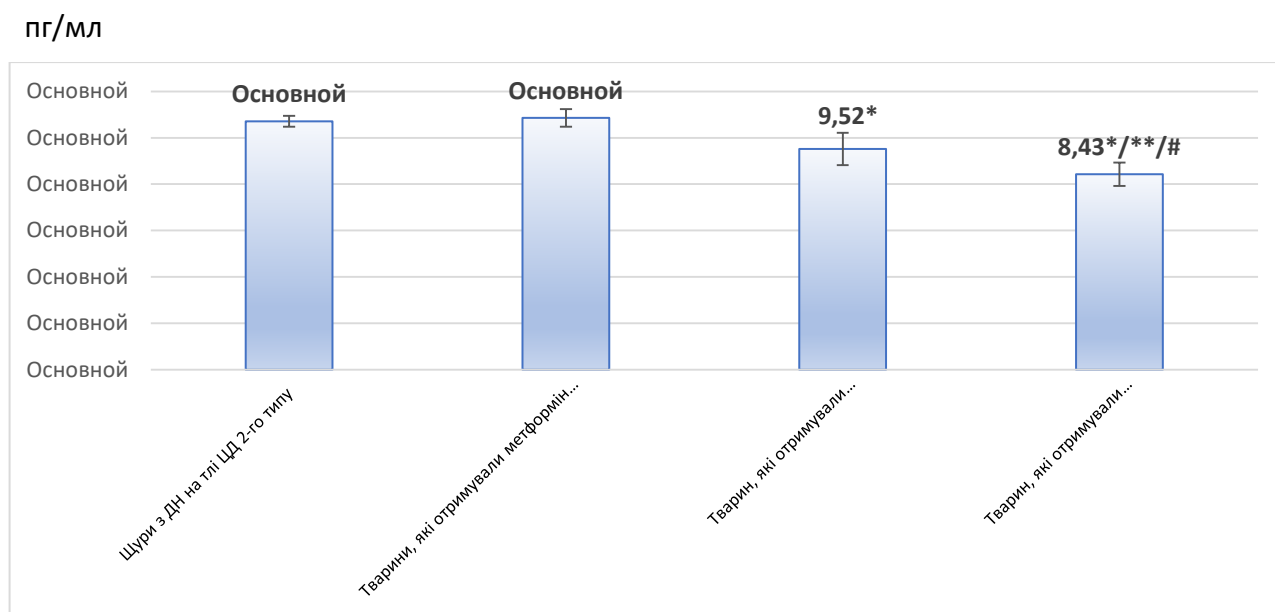


Рис. 6.2. Рівень ендотеліну-1 при застосування додаткової антиоксидантної терапії в комплексі з L-аргініном

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ відносно показників групи тварин з ДН;
2. ** - $p < 0,05$ порівняно із групою тварин, яким вводили метформін протягом 30 діб;
3. # - $p < 0,05$ порівняно із групою тварин, яким вводили метформін, біофлавоноїди та L-аргінін протягом 15 діб.

Найбільш виражені зміни досліджуваного показника спостерігали на 30 добу після початку застосування додаткової терапії. Рівень ендотеліну-1 в даній групі тварин достовірно знижувався в 1,3 рази ($p < 0,05$) відносно показників групи тварин з ДН; в 1,3 рази ($p < 0,05$) порівняно із групою тварин, яким

вводили метформін та в 1,1 рази $p<0,05$ порівняно із групою тварин, яким вводили метформін та додаткову терапію протягом 15 діб.



Рис. 6.3. Концентрація фактора фон Віллебранда при застосування додаткової антиоксидантної терапії в комплексі з L-аргініном

Примітки:

1. * - $p<0,05$ відносно показників групи тварин з ДН;
2. ** - $p<0,05$ порівняно із групою тварин, яким вводили метформін протягом 30 діб;
3. # - $p<0,05$ порівняно із групою тварин, яким вводили метформін, біофлавоноїди та L-аргінін протягом 15 діб.

Фактор Віллебранда представляє собою унікальну сполуку, яка за умов порушення цілісності ендотелію ініціює адгезію тромбоцитів, що призводить до утворення тромбу, що в подальшому відіграє ключову роль в розвитку ішемії ниркового апарату та прогресування ниркової недостатності [216].

У тварин, яким моделювали ДН на тлі ЦД 2-го типу встановлено значне підвищення рівня фактора фон Віллебранда, що може вказувати на ризик

тромбоутворення. Застосування метформіну в його ефективній дозі 60 мг/кг протягом 30 діб не призводить до достовірних змін даного показника. Введення в якості додаткової терапії біофлавоноїдів в комплексі з L-аргініном призводило до зниження рівня досліджуваного показника в 1,1 рази ($p < 0,05$) відносно показників групи тварин з контрольною патологією (ДН на тлі ЦД 2-го типу) вже на 15 добу. На 30 добу дослідження рівень фактора фон Віллебранда знижувався в 1,1 рази ($p < 0,05$) відносно тварин із ДН та в 1,1 рази ($p < 0,05$) порівняно із щурами, які отримували монотерапію метформіном.

В проведених нами дослідженнях щодо вивчення патогенетичних ланок ДН на тлі ЦД 2-го типу встановлено, що стрептозотоцинова модель ЦД у щурів відтворює зумовлену оксидом азоту загибель клітин, оскільки стрептозотозин є донатором NO, в той час як підвищений вміст NO за умов ОС може швидко перетворюватися на такі токсичні для організму сполуки, як нітрити, нітрати, пероксинітрити, триоксиду діазот та ін.

Дисбаланс у системі синтезу NO при ЦД відбувається не тільки у клітинах підшлункової залози, але й у клітинах та органах кардіоваскулярної системи, що зумовлює розвиток судинних ускладнень захворювання. Таким чином, зростання вмісту NO у сироватці крові не пов'язано з виникненням ЦД 2-го типу, але є предиктором та індикатором розвитку ряду макро- та мікроангіопатичних ускладнень на тлі ЦД 2-го типу.

На рис. 6.4 зображена динаміка рівнів eNOS та iNOS при застосуванні досліджуваної терапевтичної схеми. З цих даних видно, що при ДН на тлі ЦД 2-го типу відбувається значне зростання активності iNOS і зниження eNOS. Введення монотерапії метформіну (в його ефективній дозі 60 мг/кг) протягом 30 діб призводило до достовірного підвищення рівня eNOS ($p < 0,05$) та зниження рівня iNOS ($p < 0,05$) (рис. 6.3).

Застосування додаткової антиоксидантної терапії біофлавоноїдів у комплексі з L-аргініном протягом 30 діб призводило до достовірного підвищення рівня eNOS в 3,2 рази ($p < 0,05$) та зниження рівня iNOS в 2,1 разів ($p < 0,05$) порівняно із групою щурів з ДН. Зокрема, зміни концентрації як eNOS,

так і iNOS відмічалися вже на 15 добу: рівень eNOS підвищувався в 2,8 разів ($p<0,05$) порівняно із групою тварин із модельованою патологією, рівень iNOS знижувався в 1,2 рази ($p<0,05$) відповідно.

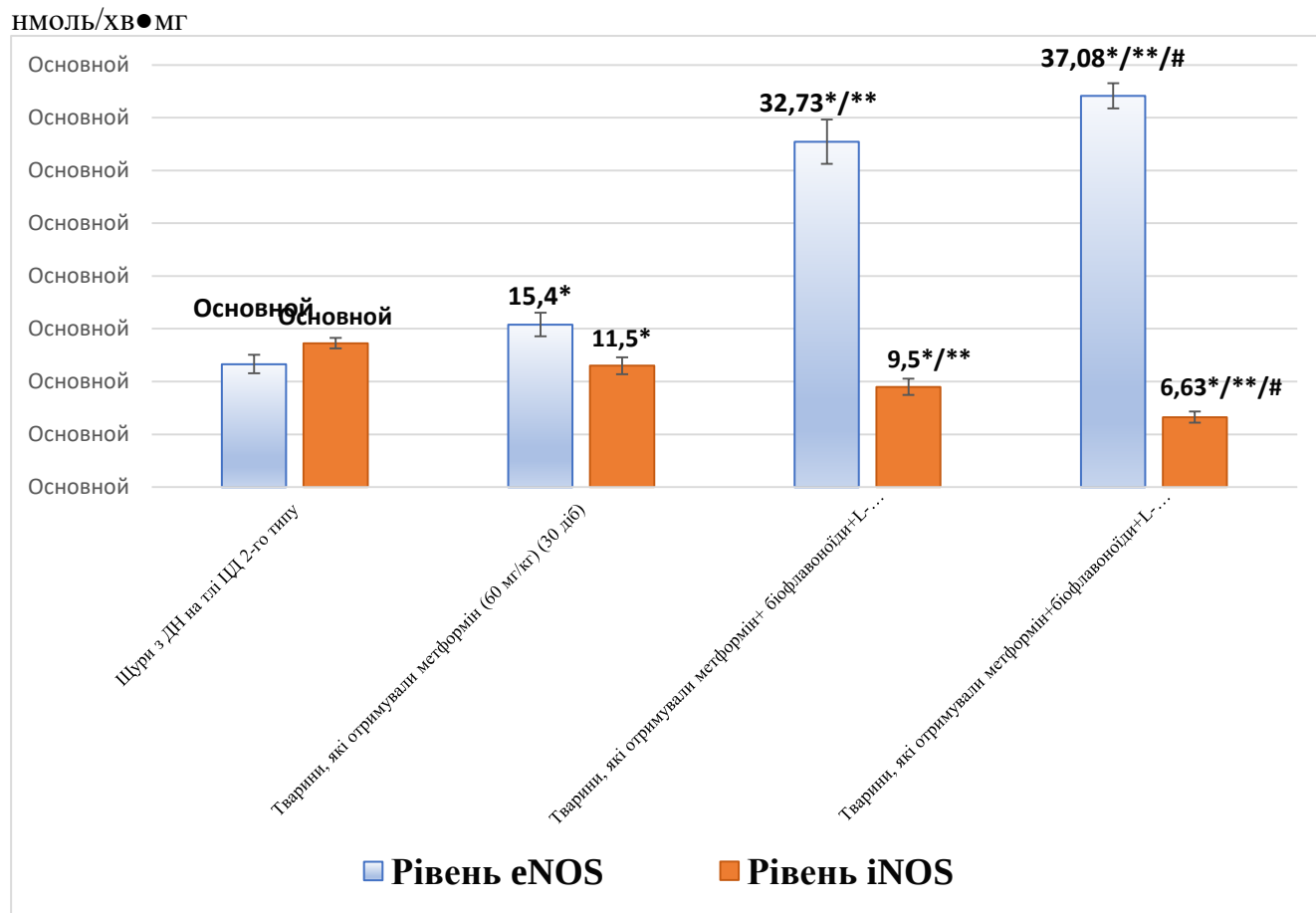


Рис. 6.4. Динаміка змін рівнів eNOS та iNOS при застосування додаткової антиоксидантної терапії в комплексі з L-аргініном

Примітки:

1. * - $p<0,05$ відносно показників групи тварин з ДН;
2. ** - $p<0,05$ порівняно із групою тварин, яким вводили метформін (30 діб);
3. # - $p<0,05$ порівняно із групою тварин, яким вводили метформін, біофлавоноїди та L-аргінін протягом 15 діб.

Одержані дані вказують на більш виражений вплив терапії біофлавоноїдів у комплексі з L-аргініном протягом 30 діб на показники ЕД порівняно із мототерапією метформіном (60 мг/кг), що дає можливість рекомендувати дану

терапевтичну схему для профілактики мікроангіопатичних діабетичних ускладнень.

6.3. Вивчення ефективності терапії на рівень проти- і прозапальних цитокінів, гострофазових показників при діабетичній нефропатії

Відомо, що цитокіни – це ендogenous медіатори, що регулюють інтенсивність і тривалість імунної та запальної відповіді. У нормі вони здійснюють взаємозв'язок між неспецифічною резистентністю організму та специфічним захистом. ЦД 2-го типу та розвиток ускладнень судинного русла є результатом активації гострофазних запальних реакцій, під час яких і відбувається вивільнення цитокінів [32, 33, 34].

Тому наступним етапом нашого дослідження було вивчення впливу додаткової терапії біофлавоноїдами у комплексі з L-аргініном на склад цитокінової ланки.

При введенні експериментальним тварин монотерапії метформіном (дозою 60 мг/кг) спостерігалось недовірне зниження рівня IL-1 β ; достовірне зниження рівня IL-2 в 1,1 рази ($p < 0,05$) та недовірне підвищення рівня IL-4, що свідчить про відсутність впливу метформіну на дану ланку патогенезу ДН (рис. 6.5).

При введенні терапії біофлавоноїдами у комплексі з L-аргініном протягом 15 діб у щурів з ДН на тлі ЦД 2-го типу спостерігалися наступні зміни рівня прозапальних цитокінів: рівень IL-1 β знижувався в 1,2 рази ($p < 0,05$), IL-2 – в 1,5 разів ($p < 0,05$), рівень IL-4 підвищувався в 1,1 рази ($p < 0,05$) відносно показників групи тварин з ДН.

На 30 добу терапії досліджувані показники мали ще більш виражену тенденцію до зниження: рівень IL-1 β знижувався в 2,5 ($p < 0,05$), IL-2 – в 3,7 разів ($p < 0,05$), рівень IL-4 підвищувався в 1,1 рази ($p < 0,05$) порівняно із групою контрольної патології.

Одержані результати достовірно перевищували рівень прозапальних цитокінів як аналогічні дані у групі щурів, які отримували терапію

метформіном в його ефективній дозі протягом 30 діб, так і у групі тварин, яким застосовували в якості додаткової терапії введення біофлавоноїдів у комплексі з L-аргініном протягом 15 діб спостереження. Крім цього відмічалось підвищення рівня протизапального цитокіну, що свідчить про «включення» захисних процесів під впливом проведеної терапії.

Введення антиоксидантної терапії у комплексі з L-аргініном протягом 30 діб призводило до значних змін гострофазових показників. Зокрема, відмічалось достовірне зниження СРБ, ФНП- α , фібриногену та резистину (рис. 6.5).

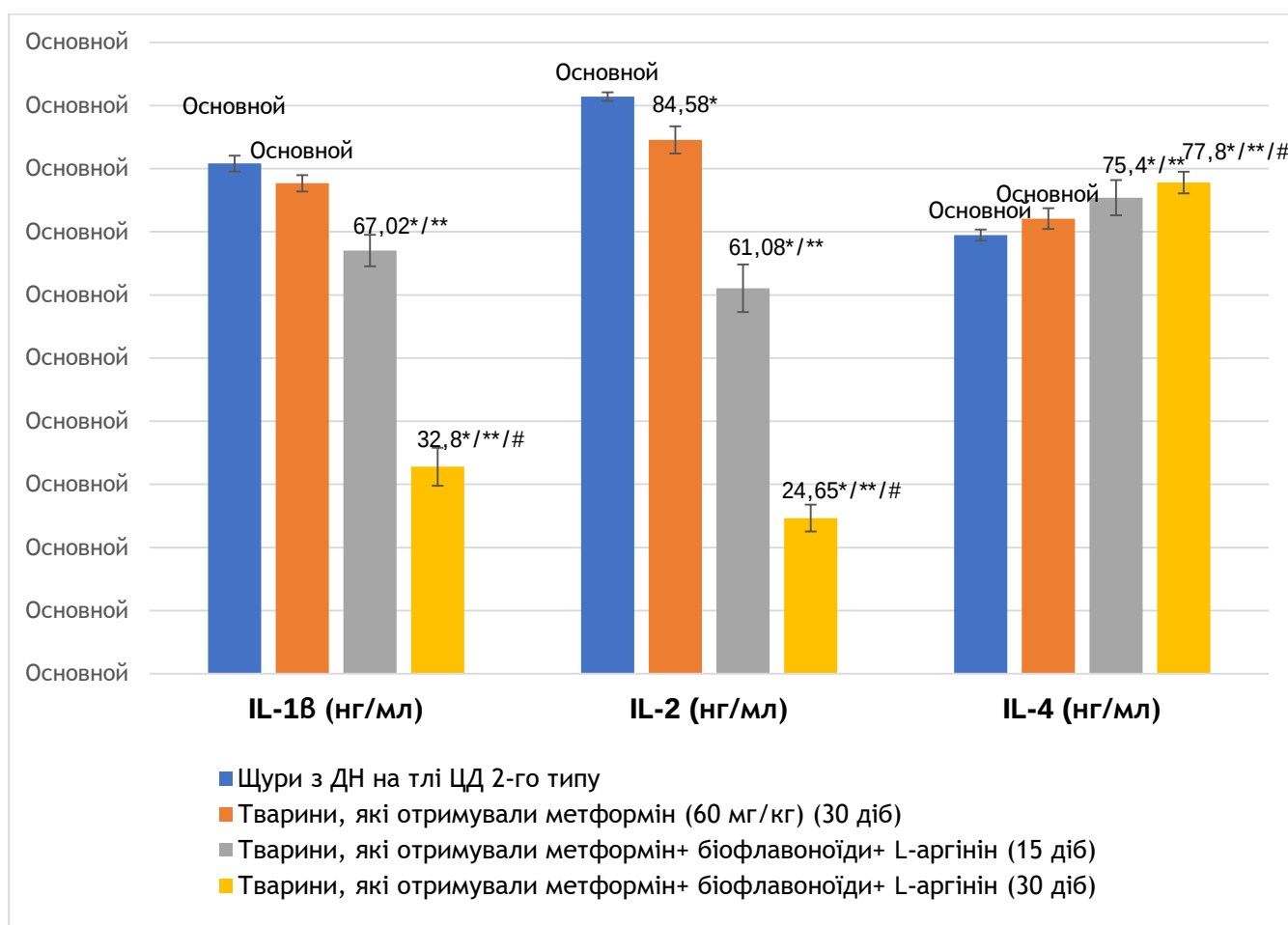


Рис. 6.5. Результати дослідження цитокінової ланки імунітету у щурів при застосування додаткової терапії біофлавоноїдами в комплексі з L-аргініном

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ відносно показників групи тварин з ДН;
2. ** - $p < 0,05$ порівняно із групою тварин, яким вводили метформін (30

діб);

3. # - $p < 0,05$ порівняно із групою тварин, яким вводили метформін, біофлавоноїди та L-аргінін протягом 15 діб.

Відомо, що рівень резистину впливає на рівень глюкози і вільних жирних кислот та знижує чутливість тканин до інсуліну. Поєднання цих факторів повинно спричиняти резистентність до інсуліну, але результати досліджень цього питання все ще залишаються суперечливими [42]. Тривають пошуки механізму, який спричиняє розвиток ІР під впливом гіперрезистинемії. Відомо, що резистин відіграє певну роль в метаболізмі глюкози, а зниження його вмісту в сироватці крові покращує гомеостаз глюкози внаслідок гальмування процесів глюконеогенезу у печінці. Цей ефект частково здійснюється через збільшення активності АМФ-активованої протеїнкінази і зниження експресії ензимів глюконеогенезу в печінці.

Враховуючи літературні дані встановлено, що при ДН на тлі ЦД 2-го типу спостерігалось різке підвищення резистину порівняно із групою інтактних щурів (рис. 6.6). При застосування монотерапії метформіном даний показник мав тенденцію до недостовірного зниження та складав $25,58 \pm 0,62$ нг/мл. Використання біофлавоноїдів у комплексі з L-аргініном протягом 15 діб призводило до достовірного зниження резистину в 1,2 рази ($p < 0,05$) порівняно із групою контрольної патології та в 1,1 разів ($p < 0,05$) відносно тварин, які отримували метформін. На 30 добу після введення біофлавоноїдів у комплексі з L-аргініном спостерігалось зниження рівня резистину в 1,4 рази ($p < 0,05$) відносно групи контрольної патології.

При вивченні рівня СРБ встановлено, що у групі тварин, які отримували метформін та додаткову терапію біофлавоноїдів у комплексі з L-аргініном протягом 15 діб, спостерігалось зниження його рівня в 1,2 рази ($p < 0,05$), а на 30 добу – в 2,5 разів ($p < 0,05$).

ФНП- α володіє цитотоксичною дією стосовно бета-клітин острівців Лангерганса підшлункової залози. При взаємодії α -ФНП із клітинами він

стимулює інгібіторне фосфорилювання серинових залишків субстратів інсулінових рецепторів 1, що є основним патогенетичним шляхом виникнення інсулінової резистентності. Таким чином цитокін виступає зв'язуючою ланкою між системним запаленням та інсуліновою резистентністю, що відіграє важливу роль в розвитку ЦД 2 типу та ускладнень.

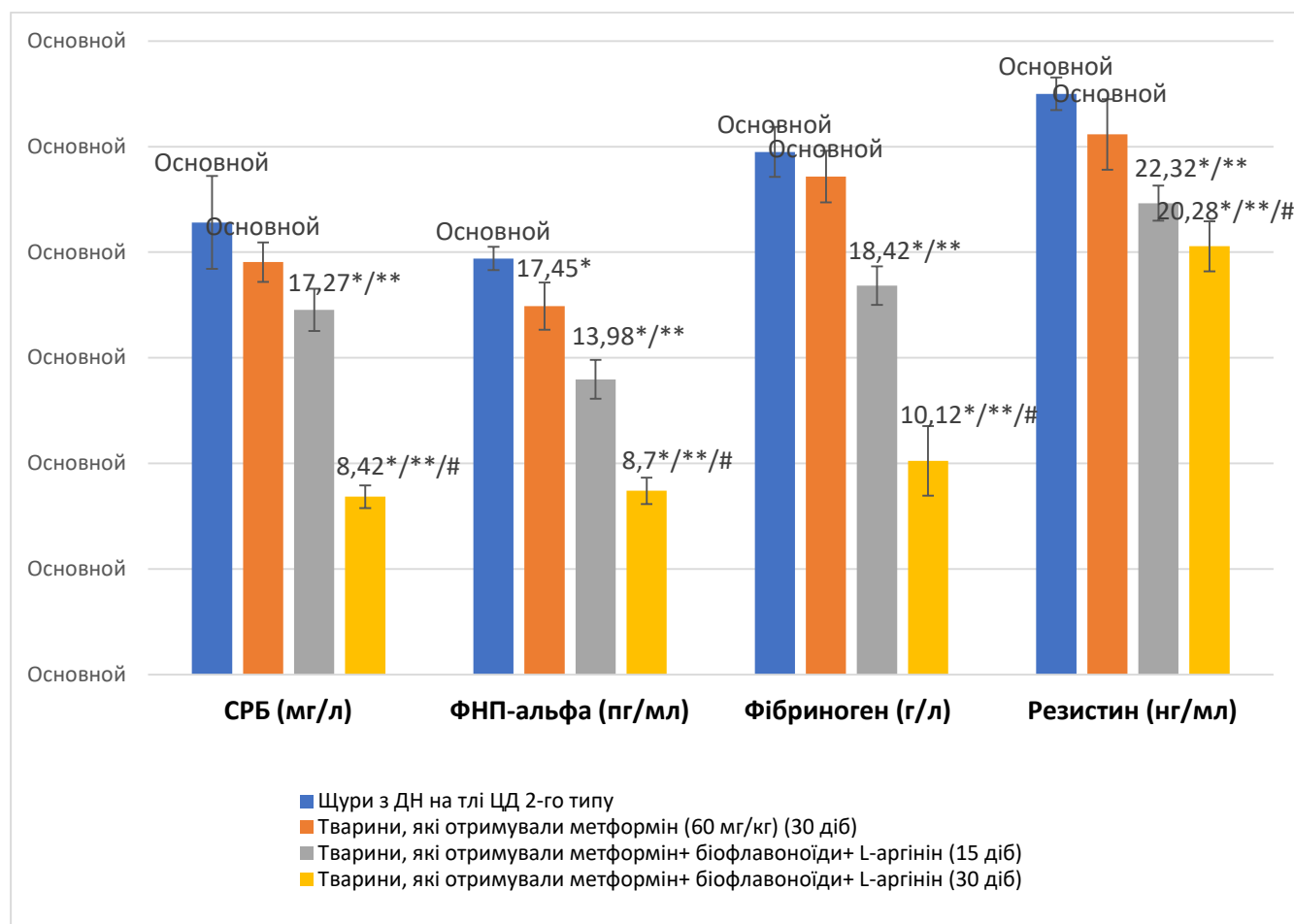


Рис. 6.6. Рівень гострофазових білків сироватки крові щурів при застосування додаткової терапії біофлавоноїдами в комплексі з L-аргініном

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ відносно показників групи тварин з ДН;
2. ** - $p < 0,05$ порівняно із групою тварин, яким вводили метформін (30 діб);
3. # - $p < 0,05$ порівняно із групою тварин, яким вводили метформін, біофлавоноїди та L-аргінін протягом 15 діб.

При дослідженні даного показника у щурів із експериментальною ДН на тлі ЦД 2-го типу, встановлено його різке підвищення, що, ймовірно, зумовлено поєднанням в патогенезі ЦД 2-го типу різноманітних взаємообтяжуючих механізмів та метаболічних порушень. При використанні монотерапії метформіном (дозою 60 мг/кг) протягом 30 діб встановлено достовірне зниження ФНП- α ,в той час як застосування біофлавоноїдів в комплексі з L-аргініном протягом 15 діб призводило до більш значного зниження рівня даного показника в 1,4 рази ($p<0,05$) відносно групи контрольної патології та в 1,2 рази ($p<0,05$) порівняно із тваринами, які отримували монотерапію метформіном (рис. 6.6).

На 30 добу після введення біофлавоноїдів у комплексі з L-аргініном спостерігалось зниження ФНП- α – в 2,3 рази ($p<0,05$) відносно групи контрольної патології та в 2,0 рази ($p<0,05$) порівняно із тваринами, які отримували метформін (60 мг/кг).

Рівень фібриногену як маркер ризику судинних ускладнень при ЦД 2-го типу також є важливою ланкою ДН, а його вміст корелює з вираженістю периферичного атеросклерозу і є визнаним фактором ризику розвитку ниркової недостатності. Введення метформіну протягом 30 діб не призводило до достовірного зниження рівня фібриногену. Однак застосування терапії біофлавоноїдів у комплексі з L-аргініном встановлено зниження рівня фібриногену – в 1,3 рази ($p<0,05$) відносно групи контрольної патології та в 1,3 рази ($p<0,05$) порівняно із тваринами, які отримували метформін (60 мг/кг). На 30 добу експериментального дослідження рівень даного показника знижувався в 2,4 рази ($p<0,05$) та 2,3 рази ($p<0,05$) відносно групи контрольної патології та щурів, які отримували терапію метформіну відповідно (рис. 6.5).

Таким чином, можна зробити висновок, що при ДН на тлі ЦД 2-го типу формується новий рівень регуляторних взаємозв'язків, де важливе значення мають зміни у синтезі цитокінів та гострофазових білків крові. Резистин на рівні із TNF- α , IL-2 та IL-6 приймає участь у регуляції стану компенсації ЦД 2-го типу, розвиток та прогресування якого тісно пов'язані із порушенням

неспецифічної ланки імунітету, що дає підстави розробляти комплексну терапію, спрямовану на пригнічення неспецифічного запалення та синтезу прозапальних цитокінів.

Аналіз одержаних результатів свідчить про виражений вплив запропонованої терапії біофлавоноїдів у комплексі з L-аргініном протягом 30-добового введення на прогресування ДН на тлі ЦД 2-го типу за рахунок зниження рівня прозапальних цитокінів та концентрації гострофазових показників.

6.4. Вплив антиоксидантної терапії та L-аргініну на показники системи перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантний захист

Наступним етапом нашої роботи було вивчення змін системи антиоксидантного захисту та перекисного окиснення ліпідів при застосуванні антиоксидантної терапії біофлавоноїдів та L-аргініну. Спочатку нами було вивчено зміни активності антиоксидантних ферментів в еритроцитах у щурів експериментальних груп (табл. 6.2).

Для відновлення глутатіону ГР використовує НАДФН як донора протонів. Відомо, що впродовж гіперглікемії активується поліоловий шлях утилізації глюкози, який використовує до 30-35 % її клітинного вмісту. При цьому глюкоза відновлюється до сорбітолу альдозоредуктазою з використання відновленого НАДФН. Виснаження концентрації відновних еквівалентів НАДФН спричиняє зниження регенерації окисненого глутатіону глутатіонредуктазою, активність якої за ДН на тлі ЦД 2-го типу достовірно нижча від контрольних показників [36, 56, 124, 170, 196, 202].

Встановлено, що при застосуванні терапії біофлавоноїдами та L-аргініну протягом 15 діб спостерігалися достовірні зміни показників, що характеризують активність антиоксидантних ферментів в еритроцитах. Зокрема, рівень глутатіонпероксидази підвищувався в 1,2 рази ($p < 0,05$),

глутатіонредуктази – в 1,7 разів ($p<0,05$), глутатіон-S-трансферази – в 1,4 рази ($p<0,05$) відносно показників групи контрольної патології.

На 30-у добу експериментальних досліджень встановлена тенденція до поступового підвищення активності ферментів в еритроцитах: глутатіонпероксидази – в 1,3 рази ($p<0,05$) відносно групи тварин з модельованою ДН та в 1,1 разів ($p<0,05$) відносно аналогічного показника на 15 добу дослідження, глутатіонредуктази – в 2,0 рази ($p<0,05$) та 1,2 рази ($p<0,05$), глутатіон-S-трансферази – в 1,5 разів ($p<0,05$) та 1,1 рази ($p<0,05$) відповідно.

Таблиця 6.2

Активність антиоксидантних ферментів в еритроцитах у щурів експериментальних груп при застосуванні антиоксидантної терапії та L-аргініну ($X \pm S_x$, $n=20$)

Показник	Щури з ДН на тлі ЦД 2-го типу	Лікування		
		Метформін (60 мг/кг) (30 діб)	Метформін + біофлавоноїди + L-аргінін (15 діб)	Метформін+ біофлавоноїди + L-аргінін (30 діб)
Глутатіонпероксидаза, ммоль/хв*л	403,17±5,27	459,0±24,3*	498±9,09 ^{*/**}	535,5±7,32 ^{*/**/ #}
Глутатіонредуктаза, ммоль/хв*л	0,19±0,03	0,25±0,03	0,32±0,03 ^{*/**}	0,38±0,02 ^{*/**/ #}
Глутатіон-S-трансфераза, ммоль/хв*л	0,72±0,04	0,89±0,08	0,99±0,09*	1,1±0,09 ^{*/**/ #}

Примітки:

1. * - $p<0,05$ відносно показників групи тварин з ДН;
2. ** - $p<0,05$ порівняно із групою тварин, яким вводили метформін (30 діб);

3. # - $p < 0,05$ порівняно із групою тварин, яким вводили метформін, біофлавоноїди та L-аргінін протягом 15 діб.

При вивченні патогенетичних ланок ДН на тлі ЦД 2-го типу одержані дані свідчать про порушення рівноваги між системами про-антиоксиданти, що вказує на поглиблення ОС клітин у разі розвитку ДН на тлі стрептозотоцинового діабету [36, 56, 124, 170, 196, 202].

При дослідженні змін системи АОЗ з урахуванням проведення комплексної терапії біофлавоноїдів та L-аргініну встановлено, що рівень ДК при застосуванні метформіну (монотерапія) вірогідно не відрізнявся від аналогічного показника у тварин із контрольною патологією. Застосування терапевтичної схеми метформін, біофлавоноїди та L-аргінін протягом 15 діб призводило до зниження рівня ДК в 1,4 рази ($p < 0,05$) порівняно із групою тварин з ДН. На 30 добу введення спостерігалось зниження ДК в 1,6 разів ($p < 0,05$) відносно щурів з контрольною патологією та в 1,1 разів ($p < 0,05$) порівняно із аналогічним показником у тварин на 15 добу після введення досліджуваних сполук (табл. 6.3).

Таблиця 6.3

Дослідження системи АОЗ при застосуванні антиоксидантної терапії та L-аргініну ($X \pm S_x$, $n=6$)

Показник	Щури з ДН на тлі ЦД 2- го типу	Лікування		
		Метформін (60 мг/кг)	Метформін + БАД + L- аргінін (15 діб)	Метформін+ БАД + L- аргінін (30 діб)
Показники антиоксидантного захисту				
ДК, нмоль/г	37,72±0,98	34,37±1,91	27,08±1,13 ^{*/**}	23,92±0,81 ^{*/**/ #}
ТБК-АП, нмоль/г	5,43±0,22	4,67±0,31 [*]	3,2±0,2 ^{*/**}	2,88±0,9 ^{*/**/ #}
ВГ, мкмоль/г	1,09±0,06	1,53±0,17 [*]	1,7±0,09 ^{*/**}	2,52±0,12 ^{*/**/ #}

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ відносно показників групи тварин з ДН;
2. ** - $p < 0,05$ порівняно із групою тварин, яким вводили метформін;
3. # - $p < 0,05$ порівняно із групою тварин, яким вводили метформін, біофлавоноїди та L-аргінін протягом 15 діб.

При застосуванні комплексної терапії біофлавоноїдів та L-аргініну протягом 15 діб також спостерігалось достовірне зниження рівня ТБК-АП в 1,7 разів ($p < 0,05$) порівняно із групою нелікованих тварин та в 1,5 разів ($p < 0,05$) відносно групи тварин, які отримували метформін (протягом 30 діб). Тривале застосування досліджуваної додаткової терапії призводило до зниження рівня ТБК-АП в 1,9 разів ($p < 0,05$) порівняно із групою контрольної патології та в 1,1 рази ($p < 0,05$) відносно 15 доби проведеного лікування.

Вміст ВГ під дією комплексної додаткової терапії біофлавоноїдів та L-аргініну також мав тенденцію до підвищення вже на 15 добу експерименту: даний показник підвищувався в 1,6 разів ($p < 0,05$) порівняно із нелікованими тваринами та в 1,1 рази порівняно із групою тварин, яким вводили метформін (30 діб). Введення досліджуваної додаткової терапії протягом 30 діб призводило до значного підвищення вміст ВГ в 2,3 рази ($p < 0,05$) порівняно із групою контрольної патології; в 1,6 разів ($p < 0,05$) відносно щурів, яким вводили метформін та в 1,5 разів ($p < 0,05$) порівняно із аналогічними даними на 15 добу експерименту.

При застосуванні додаткової терапії біофлавоноїдів та L-аргініну протягом 15 діб у тварин з модельованим ЦД 2-го типу, які отримували їжу з високим вмістом жирів, вміст МДА знижувався на 47 % ($p < 0,05$) відносно показників групи тварин з ДН, активність каталази мала тенденцію до нормалізації (табл. 6.4).

На 30 добу після введення додаткової терапії біофлавоноїдів та L-аргініну на тлі застосування метформіну в його ефективній дозі 60 мг/кг встановлено

зниження вмісту МДА на 65 % ($p<0,05$), активність каталази підвищувалася на 75 % ($p<0,05$) відносно показників групи тварин з ДН на тлі ЦД 2-го типу.

Таблиця 6.4

Дослідження системи ПОЛ при застосуванні терапії біофлавоноїдів в комплексі з L-аргініном ($X \pm S_x$, $n=6$)

Показник	Щури з ДН на тлі ЦД 2- го типу	Лікування		
		Метформін (60 мг/кг)	Метформін + БАД + L- аргінін (15 діб)	Метформін+ БАД + L- аргінін (30 діб)
Показники перекисного окиснення ліпідів				
МДА, мкмоль/л	18,02±0,41	15,9±1,04 [*]	9,5±0,72 ^{*/**}	6,18±0,41 ^{*/**/ #}
Каталаза, ммоль/л	0,2±0,03	0,24±0,04 [*]	0,25±0,04 ^{*/**}	0,35±0,02 ^{*/**/ #}

Примітки:

1. * - $p<0,05$ відносно показників групи тварин з ДН;
2. ** - $p<0,05$ порівняно із групою тварин, яким вводили метформін;
3. # - $p<0,05$ порівняно із групою тварин, яким вводили метформін, біофлавоноїди та L-аргінін протягом 15 діб.

Одержані результати експериментального дослідження свідчать про врівноваження показників, що характеризують АОЗ та ПОЛ у щурів із ДН на тлі ЦД 2-го типу. Даний фармакологічний ефект обумовлений комбінованим складом біофлавоноїдів, компонентам якого притаманна виражена антиоксидантна дія. Отримані дані перевищували всі показники групи тварин,

яким вводили метформін (60 мг/кг), що свідчить про доцільність використання в якості додаткової терапії введення біофлавоноїдів та L-аргініну протягом 30 діб на тлі застосування цукрознижувальних препаратів.

Висновки до розділу 6:

1. Введення додаткової терапії на тлі застосування метформіну (в його ефективній дозі 60 мг/кг) призводить до незначного зниження маси тіла експериментальних тварин, що, ймовірно, обумовлено, впливом антиоксидантів на певні ланки патогенезу мікросудинних ускладнень.

По мірі зниження середньої маси тіла тварин на тлі введення біофлавоноїдів та L-аргініну реєструвалося поступове зниження добового споживання води та добового діурезу.

При дослідженні рівня глюкози на 30 добу даний показник знижувався в 2,5 разів ($p < 0,05$). Дана тенденція, ймовірно, обумовлена не лише гіпоглікемічною дією метформіну (60 мг/кг), але й зумовлена наявністю в складі біофлавоноїдів простих фенолів, поліфенолів, які інгібують глюкозо-6-фосфатазу, що каталізує кінцевий етап глікогенолізу та глюконеогенезу; флавоноїдів, які поліпшують мікроциркуляцію тканин за рахунок мембраностабілізуючої та антиоксидантної дії й покращують метаболізм інсулінозалежних процесів. Крім цього, знизити рівень цукру в крові біофлавоноїди можуть за допомогою різних механізмів, у тому числі гальмуванням всмоктування глюкози в кишечнику або збільшенням її поглинання периферичними тканинами. Очевидно, що терапія антиоксидантами може бути корисною допоміжною терапією до традиційного лікування цукрознижувачами.

У групі тварин, яким вводили метформін, біофлавоноїди та L-аргінін протягом 30 діб даний показник знижувався в 2,5 разів ($p < 0,05$).

Одержані дані дозволяють свідчити, що введення протягом 30 діб в якості додаткової терапії біофлавоноїдів та L-аргініну призводить до врівноваження ліпідного обміну, безпосередньо за рахунок зниження співвідношення АпоВ-ЛП та підвищення ЛПВЩ. На 15 добу спостереження також встановлено достовірне врівноваження біохімічних показників крові, зокрема, співвідношення АпоВ-ЛП знижувалося в 1,2 рази ($p < 0,05$) порівняно із групою контрольної патології, а рівень ЛПВЩ зріс в 1,4 рази ($p < 0,05$).

2. При вивченні впливу антиоксидантної терапії та L-аргініну на тлі застосування метформіну на показники, що характеризують ЕД встановлено, що рівень ендотеліну-1 на 15 добу експерименту знижувався в 1,1 рази відносно показників групи тварин з ДН. Однак, найбільш виражені зміни досліджуваного показника спостерігали на 30 добу після початку застосування додаткової терапії. Рівень ендотеліну-1 в даній групі тварин достовірно знижувався в 1,3 рази ($p < 0,05$) відносно показників групи тварин з ДН; в 1,3 рази ($p < 0,05$) порівняно із групою тварин, яким вводили метформін та в 1,1 рази $p < 0,05$ порівняно із групою тварин, яким вводили метформін та додаткову терапію протягом 15 діб.

При дослідженні рівня фактора фон Віллебранда встановлено, що введення в якості додаткової терапії біофлавоноїдів та L-аргініну призводило до зниження рівня досліджуваного показника в 1,1 рази ($p < 0,05$) відносно показників групи тварин з контрольною патологією (ДН на тлі ЦД 2-го типу) вже на 15 добу. Аналогічні зміни спостерігалися і на 30 добу дослідження.

Застосування додаткової антиоксидантної терапії у комплексі з L-аргініном протягом 30 діб призводило до достовірного підвищення рівня eNOS в 3,2 рази ($p < 0,05$) та зниження рівня iNOS в 2,1 разів ($p < 0,05$) порівняно із групою щурів з ДН. Одержані результати вказують на виражені ендотелійпротекторні властивості, що, ймовірно, обумовлено дією L-аргініну та

посиленням ефекту за рахунок біофлавоноїдів з вираженими антиоксидантними властивостями.

3. Вивчення ефективності терапії на рівень прозапальних цитокінів, гострофазових показників при ДН на тлі ЦД 2-го типу дозволило встановити, що введення антиоксидантної терапії у комплексі з L-аргініном протягом 30 діб призводило до зниження рівня прозапальних цитокінів порівняно із аналогічними даними як у групі щурів, які отримували терапію метформіном в його ефективній дозі, так і у групі тварин, яким застосовували в якості додаткової терапії введення біофлавоноїдів у комплексі з L-аргініном на 15 добу дослідження.

Введення антиоксидантної терапії у комплексі з L-аргініном протягом 30 діб також призводило до значних змін гострофазових показників. Зокрема, відмічалось достовірне зниження СРБ, ФНП- α , фібриногену та резистину.

Аналіз одержаних результатів свідчить про виражений вплив запропонованої антиоксидантної терапії у комплексі з L-аргініном протягом 30-добового введення на прогресування ДН на тлі ЦД 2-го типу за рахунок зниження рівня прозапальних цитокінів та концентрації гострофазових показників.

4. Застосування антиоксидантної терапії та L-аргініну на тлі застосування метформіну в його ефективній дозі 60 мг/кг призводило до врівноваження показників, що характеризують АОЗ та ПОЛ у щурів із ДН на тлі ЦД 2-го типу вже на 15 добу після початку введення досліджуваних сполук.

Одержані експериментальні дані перевищували всі показники групи тварин, яким вводили метформін (60 мг/кг), що свідчить про доцільність використання в якості додаткової терапії введення біофлавоноїдів та L-аргініну протягом 30 діб на тлі застосування цукрознижувальних препаратів.

Пошук препаратів, які здатні запобігати розвиткові оксидативного стресу, посилювати функціональний стан лейкоцитів і проявляють цукрознижувальний

ефект за умов ЦД, є першочерговим у вирішенні проблеми профілактики й лікування цього захворювання та його ускладнень [36, 170, 196, 202].

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Bioflavonoids complex using in the prevention and treatment of diabetes complications / I. I. Hrytsan, I. V. Savitskyi, V. M. Sarakhan et al. *PharmacologyOnLine*. 2020. December, 30. P. 279–283.

2. Correction of endothelial dysfunction among patients suffering from diabetes mellitus / I. V. Savitsky, V. N. Sarakhan, I. V. Miastkivska, V. I. Savitsky. *Journal of Education, Health and Sport*. 2017. Vol. 7 (1). P. 621–632.

3. Патогенетичне обґрунтування метаболічної терапії ускладнень цукрового діабету / І. А. Кузьменко, І. В. Савицький, В. М. Сарахан, В. І. Савицький. *Научно-практична конференція: «Патофізіологія нирок та водно-сольового гомеостазу»*, м. Одеса, 15 – 16 лютого 2018 р. – Одеса.

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

ЦД у всьому світі визнано одним із найбільш важливих неінфекційних захворювань. Він посідає четверте місце серед провідних причин смертності в розвинених країнах [61, 74]. Як одна з найдраматичніших сторінок сучасної медицини, ЦД характеризується виключно ранньою інвалідизацією і високою летальністю, насамперед через мікро- й макросудинні ускладнення. Важливе місце серед хронічних діабетичних ускладнень займає діабетична нефропатія (ДН). Вона є актуальною медико-соціальною проблемою в усьому світі. ЦД 2-го типу, особливо ускладнений ДН, є однією з провідних причин серцево-судинних подій, розвитку термінальної стадії хронічної хвороби нирок з потребою в гемодіалізі, інвалідизації та смертності [8, 58, 77].

До 70-80-х років минулого століття серед хворих на ЦД лікування гемодіалізом потребували в основному пацієнти, що страждали на ЦД 1-го типу (до 90 %) і невелика частка припадала на хворих на ЦД 2-го типу (до 10 %). Сьогодні ж частка в загальній структурі діалізної терапії в світі не поступається частці хворих на ЦД 1-го типу та складає від 40 до 60 %. Враховуючи, що чисельність хворих на ЦД 2-го типу в 9-10 разів перевищує кількість хворих на ЦД 1-го типу можна зробити висновок, що масштаби «тихої» епідемії термінальної ниркової недостатності будуть перевищувати можливості діалізної служби в світі [79, 130, 183, 215].

Враховуючи літературні дані вітчизняних та зарубіжних науковців, встановлено, що патогенез пізніх мікроангіопатичних ускладнень (зокрема, ДН) є складний і багатокомпонентним, в основі якого лежить порушення вуглеводного обміну, гіперліпідемія, гемодинамічні розлади, зсуви гемокоагуляції, а також пошкодження функції БМ клубочків та ендотеліальних клітин. Однак наукових робіт, в яких відображений комплексний підхід до вивчення механізмів пошкодження ниркового апарату при експериментальному стрептозотоциновому діабеті, до сьогодні не проводилося. Тому, враховуючи

полісистемність ураження судин при ЦД 2-го типу актуальним та доцільним є детальне вивчення змін показників функціональної активності ендотелію, цитокінового пулу та гострофазових білків плазми крові, а також АОЗ та ПОЛ при пізніх ускладненнях ЦД 2-го типу, а також патогенетичної корекції виявлених порушень з метою попередження подальшого прогресування судинної патології.

Експериментальні дослідження виконані на 114 нелінійних щурах обох статей масою тіла 180-200 г, вирощених у розпліднику віварію Одеського національного медичного університету Міністерства охорони здоров'я України. Під час експерименту тварини перебували в умовах і на раціоні віварію відповідно з передбаченими нормативними даними. Досліди з тваринами проводили згідно встановленим правилам роботи з ними. Всі маніпуляції, які викликали біль, були проведені під етамінал-натрієвим наркозом (40 мг/кг внутрішньоочеревинно).

Робота з тваринами проводилась відповідно Міжнародним кодексом медичної етики (Венеція, 1983), «Європейською конвенцією щодо захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальними та іншими науковими цілями» (Страсбург, 1986), «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах», ухваленими 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, законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 440-IX від 14.01.2020 р. [27, 29, 67].

Для відтворення ЦД 2-го типу використовували стрептозотоцинову модель, оскільки вона дозволяє відтворити основні патогенетичні ланки ЦД 2-го типу у людини, а саме – порушення секреції та дії інсуліну та характеризується розвитком інтолерантності до вуглеводів, відносною недостатністю секреції інсуліну у відповідь на підвищений рівень глюкози та збереженням секреторної реакції на неглюкозні секретогени [11, 37, 72, 76].

Для відтворення ДН раціон експериментальних щурів базувався на

високожировому харчуванні. На 6 тиждень у тварин відзначали ознаки ДН – протеїнурію, зниження швидкості клубочкової фільтрації [1, 3, 98, 104, 109].

На початку експериментальних досліджень нами було проведено контроль у всіх групах за кількістю спожитої води за кожен добу впродовж 6-ти тижнів та добовий діурез. Окрім цього, фіксували середні величини приросту маси тіла досліджуваних тварин, визначали концентрацію глюкози в плазмі крові. Встановлено, що через 2 тижні маса тварин з експериментальним ЦД 2-го типу достовірно перевищувала аналогічні показники інтактних тварин в 1,1 рази та складала $303,3 \pm 7,45$ г; у щурів з ДН даний показник достовірно не відрізнявся від маси тіла щурів з ЦД. По мірі зростання середньої маси тіла тварин реєструвалося поступове збільшення добового споживання води, і в контрольних інтактних щурів даний показник підвищувався від $14,7 \pm 2,6$ мл в перші 2 тижні до $17,5 \pm 3,1$ мл на 6-му тижні дослідження. Також було встановлено підвищення добового діурезу.

Одержані дані вказують на те, що у тварин, яким моделювали ЦД 2-го типу одноразовим введенням стрептозотоцину дозою 65 мг/кг, відмічали достовірний приріст маси тіла, підвищення споживання води (полідипсія) та рівня добового діурезу (поліурія). Більш виражені зміни функціонального стану організму спостерігалися у групі щурів з відтворюваною ДН на тлі ЦД 2-го типу.

При дослідженні рівня глюкози в крові у щурів з експериментальним ЦД встановлено достовірно виражені та стійкі зміни даного показника: на 1-шу добу експерименту в 2,6 разів; на 3 добу – в 3,4 рази; через 2 тижні – в 3,1 рази; через 3 тижні – в 3,4 рази; через 4 тижні – в 3,2 рази; через 6 тижнів – в 3,3 рази порівняно із групою інтактного контролю. У щурів з ДН на тлі ЦД 2-го типу показники рівня глюкози плазми мали аналогічну тенденцію до підвищення як і в групі щурів з ЦД 2-го типу.

При зміні толерантності до глюкози в крові накопичується холестерин, який відкладається в ендотелії судин, звужуючи кровотік, що призводить до ураження очей, нирок, печінки, мозку і інших важливих органів та розвитку

діабетичних ускладнень. У групі щурів з ЦД 2-го типу відмічалось незначне підвищення рівня холестерину починаючи вже з 1-ї доби експерименту, в той час як в групі щурів з ДН достовірні зміни рівня холестерину спостерігалися на 3-ю добу експерименту та носили тенденцію до постійного зростання.

В експериментальних групах щурів спостерігали зростання концентрації АпоВ-ЛПП та зниження концентрації ЛПВЩ, що свідчить про атеросклеротичне пошкодження судин різного калібру. У тварин, які знаходилися на високожировому раціоні харчування відмічали достовірне підвищення рівня АпоВ-ЛПП та зниження концентрації ЛПВЩ вже на 3-ю добу дослідження.

З метою підтвердження модельної патології пізнього ускладнення ЦД 2-го типу нами було проведено дослідження виділення білка із сечею, кліренс креатиніну та вивчення можливих механізмів порушення сечоутворення.

Встановлено достовірне підвищення білка в сечі через 3 тижні проведення експерименту у тварин із ЦД 2-го типу в 3,2 рази ($p < 0,05$) порівняно із групою інтактного контролю; у щурів з ДН на тлі ЦД 2-го типу даний показник підвищувався в 3,3 рази ($p < 0,05$) відносно інтактної групи щурів, що свідчить про втрату негативного заряду мембрани ниркових клубочків внаслідок порушення синтезу протеогліканів, які входять в структуру БМ капілярів.

Показник кліренсу креатиніну у щурів з ЦД 2-го типу підвищувався через 3 тижні від початку експерименту в 2,5 разів ($p < 0,05$) порівняно із групою інтактних тварин; у щурів з ДН на тлі ЦД 2-го типу – в 3,0 рази ($p < 0,05$) відповідно. Зазначені зміни можуть бути обумовлені гіперфільтрацією креатиніну та свідчити про розвиток ранньої стадії діабетичної нефропатії.

Порушення ниркової гемодинаміки та мікроциркуляції в нефроні призводили до зниження водно- та електролітновидільної функції нирок.

При дослідженні можливого механізму пошкодження ниркового апарату на тлі експериментального ЦД 2-го типу встановлено зниження клубочкової та каналцевої реабсорбції, а також зміни екскреції калію та натрію.

Підвищення діурезу супроводжувалося підвищенням екскреції із сечею

натрію: у групі щурів з ЦД 2-го типу – в 2,85 разів ($p<0,05$), а тварин з ДН – в 3,6 разів ($p<0,05$) порівняно даними інтактною групи тварин.

Враховуючи зниження реабсорбції калію в каналцях нирок відмічалось підвищення виділення калію із сечею: у групі тварин із ЦД 2-го типу даний показник перевищував аналогічні дані інтактних тварин в 1,4 рази; у тварин з ДН – в 1,9 разів ($p<0,05$).

На заключному етапі дослідження модельної патології пізніх мікроангіопатичних ускладнень на тлі ЦД 2-го типу нами було проведено морфологічну оцінку змін ниркового апарату. У групі тварин із ДН на тлі ЦД 2-го типу відмічалось зменшення розмірів ниркових тілець із дистрофічними зміненими клітинами зовнішньої та внутрішньої стінок капсули клубочка, вогнищеве стовщення БМ капілярів клубочка, розширення мезангія.

Наступним етапом нашої роботи було вивчення ключових патогенетичних ланок в розвитку ДН на тлі ЦД 2-го типу. Встановлено, що у групі щурів з експериментальним ЦД рівень фактора фон Віллебранда підвищувався в 1,2 рази ($p<0,05$), у тварин з ДН – в 1,5 разів ($p<0,05$) порівняно із групою інтактних тварин, що, ймовірно, обумовлено тривалою гіперглікемією внаслідок чого уражається судинної стінки та велика кількість фактора фон Віллебранда зв'язується з компонентами субендотелію [68, 92, 93].

Рівень ендотеліну-1 достовірно підвищувався у всіх досліджуваних групах щурів порівняно із інтактним контролем. У щурів з ЦД 2-го типу даний показник підвищувався в 2 рази ($p<0,05$) порівняно із інтактною групою, а у щурів ДН даний показник перевищував результати інтактної групи тварин в 2,9 разів ($p<0,05$). Одержані дані пояснюються дисбалансом секреції ендотеліальних факторів, які відповідають за регуляцію тонуусу судин, системи гемостазу, процеси міжклітинної взаємодії.

Враховуючи важливу роль порушення синтезу азоту у формуванні доцільним було дослідження динаміки даних біохімічних маркерів (eNOS, так і iNOS) ЕД при ДН на тлі ЦД 2-го типу. Рівень iNOS у щурів з експериментальним ЦД підвищувався в 4,2 рази ($p<0,05$), у тварин з ДН на тлі

ЦД 2-го типу – в 5,0 разів ($p < 0,05$) відносно щурів інтактної групи. Рівень eNOS різко знижувався у щурів як з ЦД 2-го типу в 3,1 рази ($p < 0,05$), так і у щурів з діабетичними ускладненнями – в 3,9 разів ($p < 0,05$) відносно групи інтактного контролю. Більш виражені зміни рівня як eNOS, так і iNOS відмічалися при пізніх діабетичних ускладненнях мікросудинного русла (ДН). Різке зниження рівня eNOS та компенсаторне підвищення iNOS (стимулюючий ефект може викликати γ -інтерферон, інтерлейкін-1 та інші цитокіни, рівень яких при ЦД підвищується) вказує на значні зміни ендотелію судин при експериментальному ЦД.

Відомо, що однією з характерних рис перебігу ЦД 2-го типу та його пізніх ускладнень є участь у процесах запалення прозапальних цитокінів, зокрема ІЛ-1 β , ІЛ-2, ІЛ-4 та гострофазових білків (СРБ, ФНП- α , фібриноген), які відіграють ключову роль у переході локального запалення до системного, що зумовлює тяжкий перебіг захворювання. Саме розбалансованість цитокінової регуляції та порушення рівноваги альтернативних за біохімічною активністю пулів молекул спричиняє розвиток патологічного процесу [33, 66, 100, 107, 144].

Тому наступним етапом нашої роботи було вивчення змін рівнів проти-та прозапальних цитокінів, гострофазових показників плазми крові та системи АОЗ та ПОЛ при ЦД 2-го типу та при пізніх діабетичних ускладненнях.

Вміст ІЛ-1 β у щурів, яким моделювали ЦД 2-го типу перевищував аналогічний показник інтактних тварин в 1,9 разів ($p < 0,05$), в той час як у групі щурів з ДН – в 3,2 рази ($p < 0,05$). Рівень ІЛ-2, основна функція якого полягає в стимуляції специфічного клітинного імунітету, також достовірно підвищувався в 1,6 разів ($p < 0,05$) у щурів з ЦД 2-го типу та в 6,6 разів ($p < 0,05$) у тварин із ДН на тлі ЦД 2-го типу. Значне підвищення рівня ІЛ-2 у щурів із ДН на тлі ЦД 2-го типу, головною функцією якого є стимуляція проліферації, насамперед Т-клітин. Ці зміни призводять до розвитку автоімунного ушкодження організмів-мішеней, забезпечуючи безперервність запального процесу з формування патологічного хибного кола.

Рівень ІЛ-4 у щурів з ДН на тлі ЦД 2-го типу перевищував рівень інтактної групи тварин в 2,2 рази ($p < 0,05$), що можна пояснити значною вираженістю запального процесу за умов хронічної гіперглікемії. Дисбаланс цитокінової регуляції та порушення рівноваги біологічно активних пулів молекул сприяє розвитку пізніх діабетичних ускладнень.

Наступним етапом нашого дослідження було вивчення гострофазових показників. В результаті проведених досліджень встановлено, що ЦД 2-го типу супроводжується розвитком «яскравого» прозапального процесу, що підтверджується підвищенням концентрації СРБ в сироватці крові та рівня ФНП- α : у групі щурів, яким моделювали ЦД 2-го типу в 3,1 разів ($p < 0,05$), а у тварин з ДН – в 3,6 разів ($p < 0,05$) порівняно із інтактною групою щурів. Відомо, що ФНП- α гальмує сигнальні шляхи в периферичних тканинах, що призводить до підвищення інсулінорезистентності, розвитку ЕД та протромбогенні стани. Підвищений рівень ФНП- α та інших прозапальних медіаторів сприяє зниженню швидкості клубочкової фільтрації і прогресуванню хронічної хвороби нирок навіть з урахуванням впливу інших факторів. У нирках прозапальні цитокіни індукують експресію реактивних радикалів кисню, ліпідів і молекул адгезії, стимулюють патологічне накопичення матриксу і прокоагулянтну активність клітин ендотелію [155, 180, 218, 219].

Рівень фібриногену у щурів з експериментальним ЦД 2-го типу підвищувався в 1,5 разів ($p < 0,05$), в той час як у щурів з ДН даний показник зростав в 7,5 разів ($p < 0,05$) відносно показників інтактної групи. Фібриноген як важливий маркер тромбозу та запалення безпосередньо пов'язаний з розвитком атеросклеротичних змін в інтимі судин і субклінічними проявами атеросклеротичного їх ураження. При ДН на тлі ЦД 2-го типу спостерігається виражена гіперфібриногенемія, що вказує не тільки на атеросклеротичне ураження ендотелію судин, а й свідчить про запуск каскаду гемокоагуляційних зсувів при мікроангіопатичних діабетичних ускладненнях.

Рівень резистину в сироватці крові щурів з експериментальним ЦД 2-го

типу підвищувався в 1,3 рази ($p<0,05$); у тварин з ДН на тлі ЦД 2-го типу – в 1,3 рази ($p<0,05$) порівняно із інтактними тваринами.

Дослідження впливу ОС на розвиток ДН на тлі ЦД 2-го типу базувався на вивченні показників, що характеризують систему АОЗ та ПОЛ.

У щурів з експериментальних груп спостерігалось підвищення рівня ДК: у щурів з експериментальним ЦД 2-го типу в 1,4 рази ($p<0,05$), а в групі тварин з ДН на тлі ЦД 2-го типу – в 1,8 разів ($p<0,05$) порівняно з інтактною групою, що свідчило про окисне ушкодження ліпідів мембран гепатоцитів, оскільки вищезазначені сполуки є проміжними та кінцевими продуктами ПОЛ відповідно.

Вміст ТБК-АП у групі тварин із експериментальним ЦД 2-го типу підвищувався в 1,8 разів ($p<0,05$) порівняно з тваринами інтактного контролю. У тварин з ДН на тлі ЦД 2-го типу даний показник підвищувався в 2 рази ($p<0,05$) порівняно з інтактними тваринами. Розвиток ЦД 2-го типу корелював із виснаженням АОЗ: спостерігалось зниження вмісту ВГ у 1,7 разів ($p<0,05$) у тварин з ЦД 2 типу; в 2,6 разів ($p<0,05$) у тварин з ДН на тлі ЦД 2-го типу відносно групи інтактних тварин.

При вивченні системи ПОЛ встановлено, що у групах експериментальних тварин спостерігалось підвищення рівня МДА, що вказувало на активацію системи вільно-радикального окиснення. Вміст каталази у щурів з ЦД 2-го типу знижувався в 1,3 рази ($p<0,05$); у тварин з ДН на тлі ЦД 2-го типу – в 2,05 разів ($p<0,05$) порівняно із групою інтактних тварин.

Варто відмітити тенденцію до більш вираженого окисного стресу у щурів із діабетичними мікросудинними ускладненнями ЦД 2-го типу, яку 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 АОЗ та ПОЛ при ЦД 2-го типу запускає патогенетичний каскад розвитку ускладнень мікроциркуляторного русла та супроводжується тенденцією до ще більшого посилення генерації активних форм кисню і активації ПОЛ.

Ферментативна активність еритроцитів також змінювалася на тлі ДН. Такі зміни активності ферментів еритроцитів можуть бути зумовлені їх модифікацією з активним киснем і глюкозою. Від концентрації глюкози в крові залежить ступінь неферментативного глікозилювання білків, яке приводить до їх модифікації і зміни структурно-функціональних особливостей.

Зокрема, рівень глутатіонпероксидази у щурів з експериментальним ЦД 2-го типу достовірно знижувався в 1,7 разів, а у тварин з ДН – в 1,4 рази порівняно із групою інтактного контролю. Також відмічалось зниження рівня глутатіонредуктази: в 1,5 разів у щурів з ЦД 2-го типу та в 2,4 у щурів з ДН порівняно із аналогічним показником у групі інтактних тварин. Показник Глутатіон-S-трансфераза достовірно знижувався в 1,5 разів у групі тварин із модельованим ЦД 2-го типу та в 1,8 разів у щурів з ДН.

Незважаючи на стрімкий розвиток фармакотерапевтичних підходів до лікування як ЦД, так і його ускладнень, залишається актуальним розробка та впровадження нових ефективних і в той же час безпечних підходів до профілактики та лікування пізніх мікроангіопатичних ускладнень [22, 53, 54, 176].

Одним із перспективних напрямків вирішення даного завдання є використання в комплексній терапії лікарських засобів природного походження [81], що можна пояснити низкою переваг лікарських засобів природного походження, а саме малотоксичність, відсутність кумуляції, можливість тривалого використання у комбінації з іншими рослинними препаратами і хіміотерапією, а також призначення хворим будь-якого віку незалежно від ступеня важкості ЦД. З метою розробки патогенетичного підходу до профілактики та лікування ДН на тлі ЦД 2-го типу нами було проведено вивчення впливу біофлавоноїдів виробництва компанії «Ingredients for Life» (Україна) в комплексі з L-аргініном в його ефективній дозі (300 мг/кг) протягом 30 діб від початку введення на тлі цукрознижувальної терапії метформіном (в його ефективній дозі 60 мг/кг) [182]. Розрахунок дози досліджуваної терапевтичної схеми проведено із урахуванням загальноприйнятих коефіцієнтів

видової стійкості Ю. Р. Риболовлева один раз на добу [70].

Введення додаткової терапії на тлі застосування метформіну (в його ефективній дозі 60 мг/кг) призводить до незначного зниження маси тіла експериментальних тварин, що, ймовірно, обумовлено, впливом антиоксидантів на певні ланки патогенезу мікросудинних ускладнень.

По мірі зниження середньої маси тіла тварин на тлі введення біофлавоноїдів та L-аргініну реєструвалося поступове зниження добового споживання води та добового діурезу.

При дослідженні рівня глюкози на 30 добу даний показник знижувався в 2,5 разів ($p < 0,05$). Дана тенденція, ймовірно, обумовлена не лише гіпоглікемічною дією метформіну (60 мг/кг), але й зумовлена наявністю в складі біофлавоноїдів простих фенолів, поліфенолів, які інгібують глюкозо-6-фосфатазу, що каталізує кінцевий етап глікогенолізу та глюконеогенезу; флавоноїдів, які поліпшують мікроциркуляцію тканин за рахунок мембраностабілізуючої та антиоксидантної дії й покращують метаболізм інсулінозалежних процесів. Крім цього, знизити рівень цукру в крові біофлавоноїди можуть за допомогою різних механізмів, у тому числі гальмуванням всмоктування глюкози в кишечнику або збільшенням її поглинання периферичними тканинами. Очевидно, що терапія антиоксидантами може бути корисною допоміжною терапією до традиційного лікування цукрознижуючими препаратами.

У групі тварин, яким вводили метформін, біофлавоноїди та L-аргінін протягом 30 діб даний показник знижувався в 2,5 разів ($p < 0,05$).

Одержані дані дозволяють свідчити, що введення протягом 30 діб в якості додаткової терапії біофлавоноїдів та L-аргініну призводить до врівноваження ліпідного обміну, безпосередньо за рахунок зниження співвідношення АпоВ-ЛП та підвищення ЛПВЩ. На 15 добу спостереження також встановлено достовірне врівноваження біохімічних показників крові, зокрема, співвідношення АпоВ-ЛП знижувалося в 1,2 рази ($p < 0,05$) порівняно із групою контрольної патології, а рівень ЛПВЩ зріс в 1,4 рази ($p < 0,05$).

Аналіз одержаних результатів дозволив встановити, що введення біофлавоноїдів та L-аргініну протягом 30 діб на фоні застосування метформіну призводило до достовірних змін показників, що характеризують ЕД: введення в якості додаткової терапії біофлавоноїдів та L-аргініну протягом 15 діб призводило до зниження рівня ендотеліну-1 та фактора фон Віллебранда. Найбільш виражені зміни досліджуваного показника спостерігали на 30 добу після початку застосування додаткової терапії.

Застосування додаткової антиоксидантної терапії у комплексі з L-аргініном протягом 30 діб призводило до достовірного підвищення рівня eNOS та зниження рівня iNOS порівняно із групою щурів з ДН. Зокрема, зміни концентрації як eNOS, так і iNOS відмічалися вже на 15 добу. Одержані дані вказують на виражений вплив біофлавоноїдів у комплексі з L-аргініном протягом 30 діб на показники ЕД, що дає можливість рекомендувати дану терапевтичну схему для профілактики мікроангіопатичних діабетичних ускладнень.

При введенні антиоксидантної терапії біофлавоноїдами у комплексі з L-аргініном протягом 15 діб у щурів з ДН на тлі ЦД 2-го типу спостерігалися наступні зміни рівня прозапальних цитокінів: рівень IL-1 β та IL-2 знижувався, а рівень IL-4 підвищувався. Одержані результати достовірно перевищували рівень прозапальних цитокінів як аналогічні дані у групі щурів, які отримували терапію метформіном в його ефективній дозі, так і у групі тварин, яким застосовували в якості додаткової терапії введення біофлавоноїдів у комплексі з L-аргініном на 15 добу дослідження. Крім цього спостерігалось підвищення рівня протизапального цитокіну, що свідчить про «включення» захисних процесів під впливом проведеної терапії.

Введення біофлавоноїдів у комплексі з L-аргініном протягом 30 діб призводило до значних змін гострофазових показників. Зокрема, відмічалось достовірне зниження СРБ, ФНП- α , фібриногену та резистину. У групі тварин, які отримували метформін та додаткову терапію біофлавоноїдів у комплексі з L-аргініном протягом 15 діб, спостерігалось зниження рівня СРБ, ФНП- α ,

фібриногену, резистину відносно групи контрольної патології. Аналіз одержаних результатів свідчить про виражений вплив запропонованої антиоксидантної терапії у комплексі з L-аргініном протягом 30-добового введення на прогресування ДН на тлі ЦД 2-го типу за рахунок зниження рівня прозапальних цитокінів та концентрації гострофазових показників.

Наступним етапом нашої роботи було вивчення змін системи антиоксидантного захисту та перекисного окиснення ліпідів при застосуванні біофлавоноїдів та L-аргініну. Спочатку нами було вивчено зміни активності антиоксидантних ферментів в еритроцитах у щурів експериментальних груп. Встановлено, що при застосуванні біофлавоноїдів та L-аргініну протягом 15 діб спостерігалися достовірні зміни показників, що характеризують активність антиоксидантних ферментів в еритроцитах. На 30-у добу експериментальних досліджень встановлена тенденція до поступового підвищення активності ферментів в еритроцитах.

Застосування терапевтичної схеми метформін, біофлавоноїди та L-аргінін протягом 15 діб призводило до зниження рівня ДК, ТБК-АП. Вміст ВГ під дією антиоксидантної терапії та L-аргініну мав тенденцію до підвищення вже на 15 добу експерименту.

При застосуванні біофлавоноїдів та L-аргініну протягом 15 діб у тварин з моделлю ЦД 2-го типу, які отримували їжу з високим вмістом жирів, вміст МДА знижувався на 47 % ($p < 0,05$) відносно показників групи тварин з ДН, активність каталази мала тенденцію до нормалізації. На 30 добу після введення антиоксидантної терапії та L-аргініну на тлі застосування метформіну в його ефективній дозі 60 мг/кг встановлено зниження вмісту МДА на 65 % ($p < 0,05$), активність каталази підвищувалася на 75 % ($p < 0,05$) відносно показників групи тварин з ДН на тлі ЦД 2-го типу.

Одержані результати експериментального дослідження свідчать про врівноваження показників, що характеризують АОЗ та ПОЛ у щурів із ДН на тлі ЦД 2-го типу. Даний фармакологічний ефект обумовлений компонентами біофлавоноїдного комплексу, компонентам якого притаманна виражена

антиоксидантна дія. Отримані дані перевищували всі показники групи тварин, яким вводили метформін (60 мг/кг), що свідчить про доцільність використання в якості додаткової терапії введення біофлавоноїдів та L-аргініну протягом 30 діб на тлі застосування цукрознижувальних препаратів.

Сьогодні фітотерапія може використовуватися за певних типів і стадій ЦД як монотерапія в комбінації з дієтотерапією, а також як допоміжна терапія, зважаючи на важливість запобігання ускладненням ЦД – у комбінації з цукрознижувачами та інсуліном. Біофлавоноїди завдяки своїм властивостям регулювати процеси вільнорадикального окиснення в клітинах можуть вважатися засобами патогенетичної терапії порушень, які спостерігаються за ЦД. Вони не проявляють кумулятивну або токсичну дію, у дуже високих дозах не викликають будь-яких негативних явищ, на відміну від синтетичних препаратів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення і нове вирішення наукової задачі щодо дослідження патогенетичних ланок пізніх мікроангіопатичних ускладнень на тлі ЦД 2-го типу, а також розробка патогенетично обґрунтованого підходу до ефективної корекції даних станів.

1. Встановлено, що у тварин із ЦД 2-го типу через 6 тижнів експерименту маса тіла тварин зросла на 31 % порівняно із групою інтактних тварин. По мірі зростання середньої маси тіла тварин реєструвалося поступове збільшення добового споживання води та підвищення добового діурезу. При дослідженні рівня глюкози в крові у щурів з експериментальним ЦД встановлено достовірно виражені та стійкі зміни даного показника через 6 тижнів – в 3,3 рази ($p<0,05$) порівняно із групою інтактного контролю.

Більш виражені зміни функціонального стану організму спостерігалися у групі щурів, які знаходили на високожировому раціоні харчування. У тварин із модельованою діабетичною нефропатією мали місце зміни наступних показників: приріст маси тіла через 6 тижнів складав 34 % ($p<0,05$); спостерігалось підвищення добового діурезу та споживання води; показники рівня глюкози плазми мали аналогічну тенденцію до підвищення як і в групі щурів з ЦД 2-го типу.

Встановлено підвищення рівня виділення білка із сечею через 6 тижнів експерименту в групі тварин з ЦД 2-го типу в 2,7 разів ($p<0,05$) та у щурів з ДН – в 3,4 рази ($p<0,05$) порівняно із інтактною групою тварин. 3-у тижні проведення експерименту у тварин із ЦД 2-го типу в 3,2 рази ($p<0,05$), у щурів з ДН на тлі ЦД 2-го типу даний показник підвищувався в 3,3 рази ($p<0,05$) відносно інтактної групи щурів. Кліренс креатиніну у щурів з ЦД 2-го типу підвищувався через 3 тижні від початку експерименту в 2,5 разів ($p<0,05$) порівняно із групою інтактних тварин; у щурів з ДН на тлі ЦД 2-го типу – в 3,0 рази ($p<0,05$) відповідно. Також відзначалися незначні зміни клубочкової

фільтрації та канальцевої реабсорбції, зміни процесів екскреції із сечею іонів натрію та калію.

При вивченні показників, що характеризують ендотеліальну дисфункцію встановлено, що порушення балансу регуляції тону судин, системи гемостазу та процесів міжклітинної взаємодії призводить до підвищення концентрації ендотеліну-1 та різкого підвищення викиду фактора фон Віллебранда. Зокрема, рівень фактора фон Віллебранда у щурів з ЦД 2-го типу підвищувався в 1,2 рази ($p < 0,05$), у тварин з ДН – в 1,5 разів ($p < 0,05$) порівняно із групою інтактних тварин, що, ймовірно, обумовлено постійною дією агоністів на тромбоцити в результаті чого зменшується кількість гранул чи порушується реакція їх вивільнення та підвищується рівень досліджуваного фактора. У щурів з ЦД 2-го типу рівень ендотеліну-1 підвищувався в 2 рази ($p < 0,05$), а у щурів ДН даний показник перевищував результати інтактної групи тварин в 2,9 разів ($p < 0,05$). У щурів з відтворюваною діабетичною нефропатією спостерігалось різке зниження рівня eNOS (з ЦД 2-го типу в 3,1 рази ($p < 0,05$), так і у щурів з діабетичними ускладненнями – в 3,9 разів ($p < 0,05$) та компенсаторне підвищення iNOS (у щурів з експериментальним ЦД підвищувався в 4,2 рази ($p < 0,05$), у тварин з ДН на тлі ЦД 2-го типу – в 5,0 разів ($p < 0,05$), що вказує на формування значних змін ендотелію судин за умов тривалої гіперглікемії.

2. Виявлено, що порушення цитокінового профілю у щурів з діабетичною нефропатією характеризувалися підвищенням рівня прозапальних цитокінів: рівень IL-1 β у щурів, яким моделювали ЦД 2-го типу підвищувався в 1,9 разів ($p < 0,05$), в групі щурів з ДН – в 3,2 рази ($p < 0,05$); рівень IL-2 підвищувався в 1,6 разів ($p < 0,05$) у щурів з ЦД 2-го типу та в 6,6 разів ($p < 0,05$) у тварин із ДН на тлі ЦД 2-го типу. Рівень IL-4 у щурів з ДН на тлі ЦД 2-го типу перевищував рівень інтактної групи тварин в 2,2 рази ($p < 0,05$), що можна пояснити значною вираженістю запального процесу за умов хронічної гіперглікемії на противагу лабораторним тварин із модельованим ЦД 2-го типу, в яких рівень IL-4 вірогідно не відрізнявся від групи інтактних тварин. Саме розбалансованість

цитокинової регуляції та порушення рівноваги біологічно активних пулів молекул сприяє розвитку діабетичних ускладнень.

Розвиток діабетичної нефропатії на тлі цукрового діабету 2-го типу супроводжувався підвищенням концентрації СРБ (у щурів з ЦД 2-го типу в 5,6 разів ($p<0,05$); у щурів з ДН – в 6,5 разів ($p<0,05$), ФНП- α (у щурів з ЦД 2-го типу в 3,1 разів ($p<0,05$), а у тварин з ДН – в 3,6 разів ($p<0,05$), фібриногену (у щурів з ЦД 2-го типу в 1,5 разів ($p<0,05$), у щурів з ДН – в 7,5 разів ($p<0,05$) та резистину (у щурів з ЦД 2-го типу в 1,3 рази ($p<0,05$); у тварин з ДН – в 1,3 рази ($p<0,05$) в сироватці крові порівняно із інтактною групою тварин.

3. Одержані результати щодо активності антиоксидантних ферментів в еритроцитах у щурів з ЦД та ДН на тлі ЦД 2-го типу вказують на достовірне зниження рівня глутатонредуктази в 1,5 разів у щурів з ЦД 2-го типу та в 2,4 у щурів з ДН порівняно із аналогічним показником у групі інтактних тварин. Показник глутатіон-S-трансфераза достовірно знижувався в 1,5 разів у групі тварин із модельованим ЦД 2-го типу та в 1,8 разів у щурів з ДН.

4. При дослідженні змін в системі антиоксидантного захисту та перекисного окиснення ліпіди спостерігалось достовірне підвищення рівня ДК (у щурів з ЦД 2-го типу в 1,4 рази ($p<0,05$), а в групі тварин з ДН – в 1,8 разів ($p<0,05$) та ТБК-АП (у щурів з ЦД 2-го типу в 1,8 разів ($p<0,05$), а в групі тварин з ДН – в 2 рази ($p<0,05$). Розвиток цукрового діабету 2-го типу корелював із виснаженням антиоксидантного захисту, що підтверджувалося зниженням вмісту вільного глутатіону (у 1,7 разів ($p<0,05$) у тварин з ЦД 2 типу; в 2,6 разів ($p<0,05$) у тварин з ДН). Встановлено, що при пізніх ускладненнях цукрового діабету запускається активація системи вільно-радикального окиснення.

5. При вивченні впливу біофлавоноїдів та L-аргініну на тлі застосування метформіну на показники, що характеризують ендотеліальну дисфункцію встановлено, що рівень ендотеліну-1 та фактора фон Віллебранда знижувався вже на 15 добу експерименту (в 1,1 рази ($p<0,05$) відносно показників групи тварин з ДН). На 30 добу після початку застосування додаткової терапії рівень

ендотеліну-1 в даній групі тварин достовірно знижувався в 1,3 рази ($p<0,05$) відносно показників групи тварин з ДН; підвищувався рівень eNOS в 3,2 рази ($p<0,05$) відносно показників групи тварин з ДН) та знижувався – iNOS в 2,1 разів ($p<0,05$) порівняно із групою щурів з ДН, що свідчило про виражені ендотелій-протекторні властивості, які обумовлені не лише дією L-аргініну, а й за рахунок комбінованої біофлавоноїдів рослинного походження з вираженими антиоксидантними властивостями.

Застосування терапії призводило до зниження рівня прозапальних цитокінів (IL-1 β в 2,5 ($p<0,05$), IL-2 – в 3,7 разів ($p<0,05$) та підвищення протизапального цитокіну (в 1,1 рази ($p<0,05$)). Також на 30-у добу відмічалось достовірне зниження СРБ (в 2,5 разів ($p<0,05$), ФНП- α (в 2,3 рази ($p<0,05$), фібриногену (в 2,4 рази ($p<0,05$) та резистину (в 1,4 рази ($p<0,05$)). Аналіз одержаних результатів свідчить про виражений вплив запропонованої антиоксидантної терапії у комплексі з L-аргініном протягом 30-добового введення на прогресування діабетичної нефропатії на тлі стрептозотоцинового діабету за рахунок зниження рівня прозапальних цитокінів та концентрації гострофазових показників.

Застосування терапії біофлавоноїдів та L-аргініну на тлі застосування метформіну в його ефективній дозі 60 мг/кг призводило до врівноваження показників, що характеризують антиоксидантну систему захисту та перекисне окиснення ліпідів у щурів із діабетичною нефропатією вже на 15 добу після початку введення досліджуваних сполук.

Одержані експериментальні дані перевищували всі показники групи тварин, яким вводили метформін (60 мг/кг), що свідчить про доцільність використання в якості додаткової терапії введення біофлавоноїдів та L-аргініну протягом 30 діб на тлі застосування цукрознижувальних препаратів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Афанасьев К. Е., Борисова Е. А. Экономические потери от сахарного диабета: истинные масштабы проблемы в современных условиях. *Тенденции развития науки и образования*. 2017. № 3 (25). С. 28–30.
2. Бабаев Ф. Г. Дисперсионный анализ факторов риска развития хронической болезни почек. *Бюллетень науки и практики*. 2020. № 6 (9). С. 118–121.
3. 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>
4. Батрак Г. А. Диабетическая нефропатия в структуре микрососудистых осложнений сахарного диабета: сравнительная оценка особенностей течения у лиц с сахарным диабетом 1 и 2 типа. *Medicus*. 2017. № 3 (15). С. 106–107.
5. Батрак Г. А. Сравнительная характеристика острых диабетических осложнений при сахарном диабете 1 типа и 2 типа. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2019. № 1 (18). С. 26–27.
6. Батюшин М. М. Хроническая болезнь почек: современное состояние проблемы. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2020. № 16 (6). С. 938–947.
7. Бахарева Ю. С., Рымар О. Д., Чапаева Н. Н. Гемодинамические, биохимические, воспалительные, ростовые факторы у пациентов с сахарным диабетом 2 типа и доклинической диабетической нефропатией. *Лечение и профилактика*. 2016. № 2 (18). С. 77–83.
8. Бенца Т. М. Хронические осложнения сахарного диабета: рациональные подходы к диагностике и лечению. *Ліки України*. 2015. № 4 (25). С. 18–21.
9. Бережанский П. В., Бережанская Ю. П., Чуприкова Н. П. Динамика микроциркуляторных изменений у лиц с осложнениями сахарного диабета. *Молодой ученый*. 2020. № 12 (302). С. 87–92.
10. Берстнева С. В., Шаханов А. В., Янкина С. В. Гены, кодирующие

компоненты ренин-ангиотензиновой системы и факторы эндотелия, в развитии диабетической нефропатии при сахарном диабете 2 типа. *Наука молодых*. 2018. № 6 (3). С. 420–428.

11. Биджиева Ф. А. Биохимические особенности аллоксан-индуцированного сахарного диабета. *Медицинский алфавит*. 2018. № 31 (2). С. 12–14.

12. Биомаркеры и механизмы раннего повреждения сосудистой стенки / Л. А. Добрынина, Е. В. Гнедовская, А. А. Шабалина и др. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. 2018. № 2-12 (118). С. 23–32.

13. Бирюкова Е. В., Шинкин М. В. Диабетические микроангиопатии: механизмы развития, подходы к терапии. *РМЖ «Клиническая офтальмология»*. 2018. № 2. С. 91–96.

14. Вариабельность гликемии у больных сахарным диабетом с различными стадиями диабетической нефропатии / А. Р. Волкова, В. С. Мозгунова, М. Е. Черная и др. *Нефрология*. 2020. № 24 (4). С. 46–54.

15. Вербовой А. Ф., Долгих Ю. А., Вербовая Н. И. Возможно ли остановить эпидемию сахарного диабета? *Фарматека*. 2020. № 4 (27). С. 70–80.

16. Генетические аспекты диабетической нефропатии у больных сахарным диабетом 2-го типа / С. В. Берстнева, И. И. Дубинина, Ю. Ю. Бяловский и др. *Медицинский альманах*. 2017. № 6 (51). С. 140–144.

17. Глобальный доклад по диабету [Global report on diabetes]. Женева: Всемирная организация здравоохранения. 2018. 88 с.

18. Гоголева М. А., Чукриева Е. И. Диабетическая нефропатия. Диагностика. *Молодой исследователь: вызовы и перспективы*. 2020. № 2. С. 177–180.

19. Гончарова О. А., Парцхаладзе В. И., Ильина И. М. Адипонектин у больных с сахарным диабетом 2-го типа при нормальной массе тела. *Международный эндокринологический журнал*. 2015. № 1 (65). С. 23–26.

20. Данилова К. А., Ямщикова Т. В., Рахимджанова А. Р. Эпидемиологическая характеристика сахарного диабета и его осложнений. *Modern Science*. 2019. № 2 (11). С. 148–151.

21. Даренская М. А., Колесникова Л. И., Колесников С. И. Окислительный стресс: патогенетическая роль в развитии сахарного диабета и его осложнений, терапевтические подходы к коррекции. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2021. № 2 (171). С. 136–149.

22. Дедов И. И., Шестакова М. В., Майорова А. Ю. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. М.: УП ПРИНТ, 2019. 212 с.

23. Дзугкоев С. Г., Дзугкоева Ф. С., Метельская В. А. Роль оксида азота в формировании эндотелиальной дисфункции при сахарном диабете. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2010. № 9 (8). С. 63–68.

24. Диабетическая нефропатия / И. Е. Смирнов, А. Г. Кучеренко, Г. И. Смирнова, А. Р. Бадалян. *Российский педиатрический журнал*. 2015. № 4 (18). С. 43–50.

25. Диабетическая нефропатия и хроническая болезнь почек при сахарном диабете 2 типа / Е. В. Ключкова, А. А. Толмачева, Н. Н. Чернова, И. Н. Никольская. *Сибирское медицинское образование*. 2019. № 5. С. 29–37.

26. Дідушко О. М. Цукровий діабет 2-го типу і хронічна хвороба нирок: сучасні можливості цукрознижувальної терапії. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2020. № 16 (3). С. 251–256.

27. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рек. / за ред. чл.-кор. НАМН України, акад. О. В. Стефанова. К. : Авіценна, 2001. 528 с.

28. Жариков А. Ю., Щекочихина Р. О. Диабетическая нефропатия. Современный взгляд на проблему. *Бюллетень медицинских наук*. 2018. № 2 (10). С. 24–31.

29. Западнюк И. П., Западнюк В. И., Захария Е. А. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. К.: Вища школа, 1974. 304 с.

30. Зверев Я. Ф., Рыкунова А. Я. Некоторые причины развития протеинурии при нефротическом синдроме. *Нефрология*. 2020. № 24 (1). С. 9–21.

31. Іваненко Ю. О., Калмиков С. А., Калмикова Ю. С. Основні підходи до

немедикаментозного та відновного лікування хворих на цукровий діабет 2 типу. *Фізична реабілітація та рекреаційно-оздоровчі технології*. 2020. № 1 (5). С. 19–25.

32. Изменение содержания цитокинов при диабетической нефропатии / Н. Ф. Латифова, А. М. Эфендиев, Г. А. Джафарова и др. *Ліки України*. 2018. № 1 (34). С. 24–30.

33. Интерлейкин-6 и диабетическая нефропатия: патогенетические связи, мишени для нефропротекции / И. Ю. Пчелин, В. К. Байрашева, А. Н. Шишкин и др. *Juvenis Scientia*. 2017. № 12. С. 14–18.

34. Интерлейкины и их роль в прогрессировании хронической патологии почек (обзор литературы) / Д. И. Абдурашитова, Ш. Ж. Нурматов, А. Ф. Юсупов и др. *The Scientific Heritage*. 2020. № 3. С. 38–42.

35. Исследование особенностей течения сахарного диабета 2 типа / А. В. Крючкова, Н. М. Семынина, А. М. Князева, С. Д. Яковлева. *Молодежный инновационный вестник*. 2018. № 1 (7). С. 344–345.

36. Кирпичникова Е. Окислительный стресс и воспаление: роль полифенолов. *Актуальная эндокринология*. 2017. № 1. С. 71–78.

37. Колоденская В. В., Брызгалина А. В. Сахарный диабет у животных. *Интеграция науки, образования, общества, производства и экономики*. 2020. № 4. С. 18–21.

38. Костюк В. А. Растительные полифенольные соединения как компоненты функционального питания. *Труды БГУ*. 2016. № 1 (11). С. 32–41.

39. Кривонос Н. Ю., Коломиец В. В. Диабетическая нефропатия и артериальная гипертензия: актуальные вопросы нефропротекции. *Университетская клиника*. 2020. № 8. С. 77–83.

40. Куценко Л. В., Зорин И. В., Вялкова А. А. Патогенетические механизмы формирования нефропатии при сахарном диабете 1 типа. *Лечащий врач*. 2018. № 6. С. 58–62.

41. Латифова Н. Ф. Роль некоторых цитокинов при диабетической нефропатии. *Сибирский медицинский журнал*. 2019. № 4 (159). С. 35–38.

42. Лобашова В. Л., Шепелькевич А. П. Молекула резистина: строение, биологическая роль. *Медицинский журнал*. 2018. № 1. С. 22–26.
43. Мазоха А. В., Фуголь Д. С. Диабетическая нефропатия. *Scientist*. 2019. № 1 (7). С. 3–6.
44. Мазур О. А., Мусалина Л. В., Шамурова Ю. Ю. Особенности сочетанной патологии у пациентов с сахарным диабетом II типа. *Известия высших учебных заведений. Уральский регион*. 2018. № 1. С. 136–139.
45. Мальцева И. О. Сахарный диабет и качество жизни: медицинские и социокультурные аспекты. *Научный альманах*. 2019. № 3-5 (55). С. 113–115.
46. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен): учебное пособие / под ред. М. И. Прохоровой. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. 272 с.
47. Методы статистической обработки медицинских данных: метод. рек. / А. Г. Кочетов, О. В. Лянг, И. В. Жиров и др. М.: РКНПК, 2012. 42 с.
48. Механизмы развития дисфункции эндотелия и методы патогенетической коррекции при сахарном диабете / С. Г. Дзугкоев, И. В. Можаяева, О. И. Маргиева, Ф. С. Дзугкоева. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2015. № 4 (10). С. 451–459.
49. Мехман Н. М. Эпидемиология и определение сахарного диабета. *Международный журнал сердца и сосудистых заболеваний*. 2020. № 8 (26). С. 105–108.
50. Микрососудистые осложнения сахарного диабета (лекция) / Н. И. Вербовая, Ю. А. Долгих, А. Ф. Вербовой, Р. А. Галкин. *Эндокринология: новости, мнения, обучение*. 2019. № 4 (8). С. 44–54.
51. Миршаропов У. М., Усманов Р. Ж., Хасанов Н. А. Особенности сосудистых изменений при экспериментальном сахарном диабете. *Новый день в медицине*. 2020. № 2 (30). С. 695–697.
52. Мокрий В. Я., Зяблицев С. В., Борис Р. М. Порушення системи перекисного окислення ліпідів при цукровому діабеті 2-го типу (огляд літератури). *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2015. № 7 (71). С. 41–44.

53. Молчанов Н. С., Меджидова Э. М., Атаева Д. А. Развитие диабетической нефропатии у пациентов с сахарным диабетом обоих типов в зависимости от продолжительности заболевания. *Конкурс молодых ученых*. 2020. № 2. С. 294–296.

54. Моргунова Т. Б., Фадеев В. В. Современные подходы к лечению сахарного диабета 2-го типа. *Медицинский совет*. 2018. № 4. С. 17–19.

55. Муравльова О. В. Терапія цукрового діабету 2-го типу: ефективність, що доведена часом. *Семейная медицина*. 2016. № 5 (67). С. 13–14.

56. Окислительный стресс: влияние на секрецию инсулина, рецепцию гормона адипоцитами и липолиз в жировой ткани / В. В. Иванов и др. *Бюллетень сибирской медицины*. 2014. № 3 (13). С. 32–39.

57. Оленович О. А. Патолофізіологія протейнурії у динаміці розвитку алоксаніндукованого експериментального цукрового діабету. *Вісник медичних і біологічних досліджень*. 2021. № 4. С. 53–58.

58. Осложнения сахарного диабета: лечение и профилактика: монография / под ред. И. И. Дедова, М. В. Шестаковой. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2017. 744 с.

59. Особливості перебігу нефропатії у хворих на цукровий діабет 2 типу: генетичні аспекти та ангіогенез / І. І. Топчій, Т. Д. Щербань, П. С. Семеновик та ін. *Український терапевтичний журнал*. 2020. № 3. С. 15–21.

60. Оценка уровней фактора роста фибробластов (FGF-23) и маркеров воспаления у пациентов с сахарным диабетом 2 типа и различными стадиями хронической болезни почек / О. Н. Василькова, Т. В. Мохорт, В. К. Байрашева и др. *Juvenis Scientia*. 2020. № 6 (2). С. 35–44.

61. Паньків В. І. Цукровий діабет 2-го типу: сучасні міжнародні настанови, персоніфікований підхід і реальна амбулаторна практика. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2020. № 6 (16). С. 463–470.

62. Патоморфологическая картина диабетической нефропатии при экспериментальном сахарном диабете / С. О. Филинова, А. Ю. Жариков, И. П. Бобров и др. *Казанский медицинский журнал*. 2019. № 1 (100). С. 147–152.

63. Подходы к лечению диабетической нефропатии (обзор литературы) / А. Э. Багрий, М. В. Хоменко, О. И. Шверова, А. И. Титиевская. *Нефрология*. 2021. № 25 (1). С. 18–30.
64. Подходы к лечению диабетической нефропатии (обзор литературы) / А. Э. Багрий, М. В. Хоменко, О. И. Шверова, А. И. Титиевская. *Нефрология*. 2021. № 1 (25). С. 18–30.
65. Показатели прооксидантного и антиоксидантного статусов в почках крыс при экспериментальном сахарном диабете / С. О. Филинова, А. Ю. Жариков, О. Н. Мазко и др. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020. № 64 (1). С. 124–127.
66. Пчелин И. Ю., Шишкин А. Н., Лаптева О. А. Роль системного и локального воспаления в развитии диабетической нефропатии. *Нефрология*. 2011. Т. 15. № 4. С. 21–26.
67. Резніков О. Г., Соловйов 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.
68. Роль эндотелиального фактора роста сосудов в патогенезе диабетической нефропатии / О. Н. Шишко, Т. В. Мохорт, Е. Э. Константинова и др. *Медицинский журнал*. 2013. № 1 (43). С. 132–135.
69. Роль эпигенетических механизмов в патогенезе диабетической нефропатии / К. А. Айтбаев, И. Т. Муркамилов, В. В. Фомин и др. *Нефрология*. 2021. № 25 (2). С. 35–42.
70. Рыболовлев Ю. Р., Сидяров Д. П., Афонин Н. И. Прогностическая оценка безопасности веществ для человека по константам их биологической активности. *Токсикологические аспекты безопасности готовых лекарственных форум: тез. докл. науч. конф.* Москва, 16-18 декабря 1981 г. М., 1981. С. 9–10.
71. Самолук М. О., Григорьева Н. Ю. Оценка эндотелиальной дисфункции и возможности ее коррекции на современном этапе у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями. *Кардиология*. 2019. № 59 (3). С. 4–9.
72. Самотруева М. А., Сергалиева М. У. Сахарный диабет: особенности

экспериментального моделирования. *Астраханский медицинский журнал*. 2019. № 3 (14). С. 45–57.

73. Сахарный диабет 2 типа и множественные хронические заболевания / Н. С. Асфандиярова, О. В. Дашкевич, Н. В. Дорошина, Е. И. Сучкова. *Сахарный диабет*. 2018. № 6 (21). С. 455–461.

74. Сахарный диабет 2 типа у взрослых / И. И. Дедов, М. В. Шестакова, А. Ю. Майоров и др. *Сахарный диабет*. 2020. № 23. С. 4–102.

75. Сахарный диабет: факторы риска развития и осложнения. Современные тенденции / В. В. Гарбузов, В. А. Морозов, А. В. Маслов, Р. Ф. Хафизов. *Аллея науки*. 2020. № 2 (1). С. 171–177.

76. Стрептозотоциновая модель стабильного сахарного диабета / Г. Н. Скалецкая, Н. Н. Скалецкий, Е. А. Волкова, В. И. Севастьянов. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2018. № 4 (20). С. 83–88.

77. Струков Е. Л., Похлебкина А. А. Сахарный диабет. Некоторые современные эпидемиологические, генетические и онтогенетические аспекты. *Университетский терапевтический вестник*. 2020. № 2 (3). С. 42–48.

78. Тадтаева Н. Е. Эндотелиальная дисфункция у больных сахарным диабетом 2 типа как предиктор сердечно-сосудистых осложнений. *Медицина и фармацевтика*. 2019. № 6 (7). С. 4–6.

79. Тарасенко Н. А. Сахарный диабет: действительность, прогнозы, профилактика. *Современные проблемы науки и образования*. 2017. № 2. С. 34–37.

80. Урванова Е. Ю. Методы диагностики диабетической нефропатии. *Проблемы теории и практики современной науки*. 2020. № 6. С. 124–127.

81. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю. С. Тараховский и др. Пушино: Synchronobook, 2013. 310 с.

82. Франческо Индовина, Пьеркало Фалцетта, Стефано Дель Прато. Сахарный диабет 2 типа. Комбинированная терапия на старте заболевания. *Сахарный диабет*. 2018. № 21 (5). С. 336–344.

83. Ханова И. М. Анализ патогенеза сахарного диабета. *Современные*

научные исследования и разработки. 2018. № 10 (27). С. 887–888.

84. Ходжаева Ф. С. Клинические аспекты сахарного диабета. *Spirit time.* 2019. № 9 (21). С. 24–26.

85. Хроническая болезнь почек при сахарном диабете 2 типа: частота, причины развития, особенности сахароснижающей терапии / И. А. Бондарь, Е. А. Зенкова, И. П. Краснопевцев, О. Ю. Шабельникова. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2017. № 1 (37). С. 81–87.

86. Хроническая почек и диабетическая нефропатия: классификация и современные принципы диагностики / В. И. Золоедов, Т. М. Черных, А. П. Волынкина и др. *Многопрофильный стационар.* 2018. № 5 (1). С. 36–43.

87. Царик І. О., Пашковська Н. В. Фенотип діабетичної хвороби нирок (огляд літератури та власні дані). *Міжнародний ендокринологічний журнал.* 2020. № 16 (3). С. 265–271.

88. Чекман І. С., Бондур В. В., Клименко О. В. Комбінована фармакотерапія цукрового діабету 2-го типу. *Рациональная фармакотерапия.* 2016. № 2 (39). С. 25–31.

89. Шестакова М. В. Сахарный диабет и хроническая болезнь почек: возможности прогнозирования, ранней диагностики и нефропротекции в XXI веке. *Терапевтический архив.* 2016. № 6. С. 84–88.

90. Шестакова М. В., Сухарева О. Ю. Диагностика и выбор метода лечения сахарного диабета 2 типа. *Клиническая фармакология и терапия.* 2018. № 2 (27). С. 3–9.

91. Шпаков А. О., Казначеева Е. В. Молекулярные механизмы апоптоза гломерулярных подоцитов в условиях диабетической нефропатии. *Биологические мембраны.* 2020. № 37 (4). С. 243–263.

92. Эндотелиальная дисфункция и нарушение лимфатического дренажа тканей в патогенезе диабетических микроангиопатий / А. Я. Мамедзаде, М. Х. Алиев, Ш. М. Гусейнова и др. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020. № 1 (64). С. 91–97.

93. Эндотелий-зависимая сосудистая реактивность при сахарном диабете 2

типа / К. Ю. Николаев и др. *Клиническая практика*. 2017. № 4. С. 61–65.

94. Энциклопедия клинических лабораторных тестов / под. ред. Н. У. Тица / перевод под. ред. В. В. Меньшикова. М.: «Лабинформ», 1997. С. 160–161.

95. Яркова Н. А. Нефрин – ранний маркер повреждения почек при сахарном диабете 2-го типа. *Медицинский альманах*. 2017. № 2 (47). С. 101–103.

96. Ярмыш Н. В., Грозная Л. Н. Эндотелиальная дисфункция и ее регуляторные механизмы. *Вісник проблем біології і медицини*. 2014. № 3 (111). С. 37–43.

97. Ярошенко Т. Я. Дослідження впливу інгібіторів синтази оксиду азоту на його синтез у тканинах щурів з токсичним ураженням печінки. *Медична та клінічна хімія*. 2016. № 4 (18). С. 82–85.

98. A disease model of diabetic nephropathy in a glomerulus-on-a-chip microdevice / L. Wang, T. Tao, W. Su et al. *Lab on a Chip*. 2017. Vol. 17 (10). P. 1749–1760.

99. Adipokines and obesity. Potential link to metabolic disorders and chronic complications / K. Zorena, O. Jachimowicz-Duda, D. Slezak et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 10 (21). e3570.

100. Adiponectin for the treatment of diabetic nephropathy / J. Y. Lee, J. W Yang, B. G. Han et al. *Korean Journal of International Medicine*. 2019. Vol. 3 (34). P. 480–491.

101. Al-Lawati J. Diabetes mellitus: a local and global public health emergency! *Oman medical journal*. 2017. Vol. 3 (32). P. 177–180.

102. American Diabetes Association's Standards of Medical Care in Diabetes – 2018. *Diabetes Care*. 2018. 41 (1). P. 13–27.

103. An assessment of self-care knowledge among patients with diabetes mellitus / S. Alhaik, H. A. Anshasi, J. Alkhawaldeh et al. *Diabetes & Metabolic Syndrome*. 2019. Vol. 13 (1). P. 390–394.

104. Animal models and renal biomarkers of diabetic nephropathy / L. Perez-Lopez, M. Boronat, C. Melian et al. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2021. Vol. 1307. P. 521–551.

105. Animal models of obesity and diabetes mellitus / M. Kleinert, C. Clemmensen, S. Hofman et al. *Nature Reviews Endocrinology*. 2018. Vol. 3 (43). P. 110–115.
106. Antioxidant treatment attenuates lactate production in diabetic nephropathy / C. Laustsen, P. M. Nielsen, T. S. Norlinger et al. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2017. Vol. 1 (312). P. 192–199.
107. Assessment of the diagnostic value of different biomarkers in relation to various stages of diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients / K. Al-Rubean, K. Siddiqui, M. Al-Ghonaim et al. *Scientific reports*. 2017. Vol. 7 (1). P. 1–9.
108. Association of C-peptide with diabetic vascular complications in type 2 diabetes / Y. Wang, H. Wan, Y. Chen et al. *Diabetes & Metabolism*. 2020. Vol. 1 (46). P. 33–40.
109. Azushima K., Gurley S. B., Coffman T. M. Modelling diabetic nephropathy in mice. *Nature Reviews Nephrology*. 2018. Vol. 14 (1). P. 48.
110. Bakris G. L., Molitch M. Microalbuminuria as a risk predictor in diabetes: The Continuing Saga. *Diabetes Care*. 2014. Vol. 37. P. 867–875.
111. Biomarkers of diabetic nephropathy / N. Papadopoulou-Marketou, C. Kanaka-Gantenbein, N. Marketos et al. *Critical Reviews in Clinical Laboratory*. 2017. Vol. 5 (54). P. 326–342.
112. Bone marrow endothelial cells regulate myelopoiesis in diabetes mellitus / F. F. Hoyer, X. Zhang, E. Coppin et al. *Circulation*. 2020. Vol. 3 (142). P. 244–258.
113. Bramham K. Diabetic nephropathy and pregnancy. *Seminars in nephrology*. 2017. Vol. 37 (4). P. 362–369.
114. Brown R. B. Diabetes, diabetic complications, and phosphate toxicity: A scoping review. *Current diabetes reviews*. 2020. Vol. 7 (16). P. 674–689.
115. Brunskill N. J. C-peptide and diabetic kidney disease. *Journal of Internal Medicine*. 2017. Vol. 1 (281). P. 41–51.
116. Cell-based therapies for experimental diabetic nephropathy: a systematic review and meta-analysis / H. J. Tang, Z. G. Tian, X. Yang et al. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 2016. Vol. 4 (30).

P. 1047–1051.

117. Cellular and molecular aspects of diabetic nephropathy: the role of VEGF-A / K. Carranza, D. Veron, A. Cercado et al. *Nefrologia*. 2015. Vol. 2 (35). P. 131–138.

118. Chang M. S., Hsu Y. H. The role of IL-20 in chronic kidney disease and diabetic nephropathy: pathogenetic and therapeutic implications. *Journal of Leukocyte Biology*. 2018. Vol. 5 (104). P. 919–923.

119. Chronic complications of diabetes mellitus: a mini review / M. Lofty, J. Adeghate, H. Kalasz, J. Singh. *Current Diabetes Reviews*. 2015. Vol. 13 (1). P. 255–234.

120. Clinico-pathological features of kidney disease in diabetic cases / K. Furuichi, M. Shimizu, H. Okada et al. *Clinical and Experimental Nephrology*. 2018. Vol. 5 (22). P. 1046–1051.

121. Cole J. B., Florez J. C. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nature Reviews Nephrology*. 2020. Vol. 16 (7). P. 377–390.

122. Complement activation in patients with diabetic nephropathy / X. Q. Li, D. Y. Chang, M. Chen, M. H. Zhao. *Diabetes Metabolites*. 2019. Vol. 3 (45). P. 248–253.

123. Complement deposition on renal histopathology of patients with diabetic nephropathy / Z. J. Sun, X. Q. Li, D. Y. Chang et al. *Diabetes Metabolism*. 2019. Vol. 4 (45). P. 363–368.

124. Correlation between oxidative stress and hematological profile abnormalities in diabetic nephropathy / A. Abdel-Moneim, B. Mahmoud, A. Nabil, Z. Nageem. *Diabetes Metabolic Syndrome*. 2019. Vol. 4 (13). P. 2365–2373.

125. Current therapies and targets for type 2 diabetes mellitus / D. K. Chellappan et al. *Panminerva Med*. 2018. Vol. 3 (60). P. 117–131.

126. Diabetes mellitus: endothelial dysfunction and changes in hemostasis / B. Babik, F. Petak, S. Agocs et al. *Orvosi hetilap*. 2018. Vol. 33 (159). P. 1335–1345.

127. Diabetic kidney disease: a systematic review on the role of epigenetics as diagnostic and prognostic marker / S. Singh, S. K. Sonkar, G. K. Sonkar, A. A. Mahdi. *Diabetes / Metabolism Research and Reviews*. 2019. Vol. 5 (35). e3155.

128. Diabetic microangiopathy: Pathogenetic insights and novel therapeutic approaches / R. Madonna et al. *Vascul Pharmacol*. 2017. Vol. 90. P. 1–7.

129. Diabetic nephropathy and endothelial dysfunction: current and future therapies and emerging of vascular imaging for preclinical renal-kinetic study / W. K. Leung, L. Gao, P. M. Siu, C. W. Lai. *Life Science*. 2016. Vol. 166. P. 121–130.

130. Diabetic nephropathy in the elderly – clinical practice / K. Nadolnik, D. Skrypnik, K. Skrypnik, P. Bogdanski. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2018. Vol. 4 (69). P. 327–334.

131. Diabetic nephropathy: an update on pathogenesis and drug development / R. Vasanth, S. H. Tan, M. Candasamy, S. K. Bhattamisra. *Diabetes Metabolic Syndrome*. 2019. Vol. 1 (13). P. 754–762.

132. Diabetic nephropathy: focus on current and future therapeutic strategies / R. Pofi, F. Di Mario, A. Gigante et al. *Current Drug Metabolism*. 2016. Vol. 5 (17). P. 497–502.

133. Drug delivery systems for diabetes treatment / B. L. Zaric, M. Obradovic, E. Sudar-Milovanovic et al. *Current Pharmaceutical Design*. 2019. Vol. 2 (25). P. 166–173.

134. Dymkowska D. Oxidative damage of the vascular endothelium in type 2 diabetes - the role of mitochondria and NAD(P)H oxidase. *Postepy Biochem*. 2016. № 2 (62). P. 116–126.

135. Effects of age and gender on acute complications of hemodialysis in patients with chronic kidney disease secondary to diabetes mellitus / A. Billal, F. Uz Zaman, S. Muhammad et al. *Pakistan Armed Forces Medical Journal*. 2020. Vol. 3 (70). P. 781–786.

136. Effects of neutrophil-lymphocyte ration on renal function and histological lesions in patients with diabetic nephropathy / J. Zhang, R. Zhang, Y. Wang et al. *Nephrology*. 2019. Vol. 11 (24). P. 1115–1121.

137. Effects of probiotics on diabetic nephropathy: a systematic review / E. Vlachou, A. Ntikoudi, O. Govina et al. *Current clinical pharmacology*. 2020. Vol. 15 (3). P. 234–242.

138. Elbassuoni E. A., Aziz N. M., El-Tahawy N. F. Protective effect of C-peptide on experimentally induced diabetic nephropathy and the possible link between C-peptide and nitric oxide. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*. 2018. Vol. 6 (43). P. 617–624.
139. Elmarakby A. A., Sullivan J. C. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *Cardiovascular therapies*. 2012. Vol. 1 (30). P. 49–59.
140. Endothelial dysfunction and platelet hyper aggregation in type 2 diabetes mellitus: the era of novel anti-diabetic agents / D. Stylianos, K. Georgia, P. Dimitrios et al. *Current Medicinal Chemistry*. 2018. Vol. 27 (34). P. 5663–5672.
141. Endothelin-receptor antagonists for diabetic nephropathy: a meta-analysis / W. Yuan, Y. Li, J. Wang et al. *Nephrology*. 2015. Vol. 7 (20). P. 459–466.
142. Epidemiology of type 2 diabetes – global burden of disease and forecasted trends / M. Khan, M. Hashim, J. King et al. *Journal of Epidemiology and Global Health*. 2020. Vol. 10 (1). P. 107–111.
143. Epigenetics in diabetic nephropathy, immunity and metabolism / S. T. Keating, J. A Van Diepen, N. P. Riksen, A. El-Osta. *Diabetologia*. 2018. Vol. 61 (1). P. 6–20.
144. Evaluation of serum adiponectin levels in diabetic nephropathy / A. Alnaggar, M. Sayed, K. E. El-Deena et al. *Diabetes Metabolic Syndrome*. 2019. Vol. 1 (13). P. 128–131.
145. Fighting type-2 diabetes: present and future perspectives / C. G. Yu, Y. Fu, Y. Fang et al. *Current Medicinal Chemistry*. 2019. Vol. 10 (26). P. 1891–1907.
146. Genco R. J., Graziani F., Hasturk H. Effects of periodontal disease on glycemic control, complications, and incidence of diabetes mellitus. *Periodontology*. 2020. Vol. 1 (83). P. 59–65.
147. Global patterns of comprehensive cardiovascular risk factor control in patients with type 2 diabetes mellitus: insights from the DISCOVER study / K. K. Patel, M. B. Gomes, B. Charbonnel et al. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2021. Vol. 1 (23). P. 39–48.

148. Global prevalence of metabolic syndrome among patients with type I diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis / R. Belete, Z. Ataro, A. Abdu, M. Sheleme. *Diabetology & Metabolic syndrome*. 2021. Vol. 1 (13). P. 1–13.
149. Glomerular mesangial cell and podocyte injuries in diabetic nephropathy / C. W. Tung, Y. C. Hsu, Y. H. Shih et al. *Nephrology*. 2018. Vol. 4. P. 32–37.
150. Gnudi L., Coward R. J. M., Long D. A. Diabetic nephropathy: perspective on novel molecular mechanisms. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2016. Vol. 11 (27). P. 820–830.
151. Gordon C. Blood glucose monitoring in diabetes: rationale and procedure. *British Journal of Nursing*. 2019. Vol. 7 (28). P. 434–439.
152. Hooten N. N., Evans M. K. Extracellular vesicles as signaling mediators in type 2 diabetes mellitus. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2020. Vol. 6 (318). P. 1189–1199.
153. Horton W. B., Barrett E. J. Microvascular dysfunction in diabetes mellitus and cardiometabolic disease. *Endocrine Reviews*. 2021. Vol. 42 (1). P. 29–55.
154. Identification of C3 as a therapeutic target for diabetic nephropathy by bioinformatics analysis / ShuMei Tang, XiuFen Wang, TianCi Deng et al. *Scientific reports*. 2020. Vol. 10 (1). P. 1–12.
155. Immunity and inflammation in diabetic kidney disease: translating mechanisms to biomarkers and treatment targets / R. Pichler, M. Afkarian, B. P. Dieter, K. R. Tuttle. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2017. Vol. 4 (312). P. 716–731.
156. Inflammation in diabetic nephropathy: moving toward clinical biomarkers and targets for treatment / F. Barutta, G. Bruno, S. Grimaldi, G. Gruden. *Endocrine*. 2015. Vol. 3 (48). P. 730–742.
157. Inflammatory response and timeline of chronic complications in patients with type 1 and 2 diabetes mellitus / A. Cutas, C. Drugan, G. Roman et al. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*. 2020. Vol. 40. P. 561–569.
158. Inflammatory targets in diabetic nephropathy / J. Donate-Correa, D. Luis-

Rodriguez, E. Martin-Nuner et al. *Journal of clinical medicine*. 2020. Vol. 9 (2). P. 458–452.

159. Is oxidative stress of adipocytes a cause or a consequence of the metabolic syndrome? / L. N. Maslov et al. *J Clin Transl Endocrinol*. 2019. Vol. 15. P. 1–5.

160. John S. Complication in diabetic nephropathy. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2016. Vol. 4 (10). P. 247–249.

161. Kaempferol attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy by downregulating TRAF6 expression: The role of TRAF6 in diabetic nephropathy / W. Luo, X. Chen, L. Ye et al. *Journal of Ethnopharmacology*. 2021. Vol. 268. P. 113–119.

162. Karthikeyan E., Pawar R. V. Role of catechins in diabetes mellitus. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*. 2021. Vol. 8 (2). P. 1730–1735.

163. Keresztes P., Peacock-Johnson A. CE: type 2 diabetes: a pharmacological update. *The American Journal of Nursing*. 2019. Vol. 3 (119). P. 32–40.

164. Krishna C. Keri, Naga S. Samji, Samuel Blumenthal. Diabetic nephropathy: newer therapeutic perspectives. *Journal of community hospital internal medicine perspectives*. 2018. Vol. 8 (4). P. 200–207.

165. Kushwaha K., Sharma S., Gupta J. Metabolic memory and diabetic nephropathy: beneficial effects of natural epigenetic modifiers. *Biochimie*. 2020. Vol. 170. P. 140–151.

166. Laboratory parameters of hemostasis, adhesion molecules, and inflammation in type 2 diabetes mellitus: correlation with glycemic control / E. Palella, R. Cimino, S. Pullano et al. *Environmental Research and Public Health*. 2020. Vol. 1 (17). P. 300–306.

167. Maestroni S., Zerbini G. Glomerular endothelial cells versus podocytes as the cellular target in diabetic nephropathy. *Acta Diabetology*. 2018. Vol. 11 (55). P. 1105–1111.

168. Mahaboob Khan Sulaiman. Diabetic nephropathy: recent advances in pathophysiology and challenges in dietary management. *Diabetology & metabolic*

syndrome. 2019. Vol. 11 (1). P. 1–5.

169. Management of diabetic mellitus in chronic kidney disease / V. Garla, S. Kanduri, L. Yanes-Cardozo et al. *Minerva Endocrinology*. 2019. Vol. 3 (44). P. 273–287.

170. Manpreet K. Sagoo, Luigi Gnudi. Diabetic nephropathy: is there a role for oxidative stress. *Free radical biology and medicine*. 2018. Vol. 116. P. 50–63.

171. Maranta F., Cianfanelli L., Cianflone D. Glycaemic control and vascular complications in diabetes mellitus type 2. *Experimental Medicine and Biology*. 2021. Vol. 1307. P. 129–152.

172. Mauer M., Doria A. Uric acid and diabetic nephropathy risk. *Contribution of Nephrology*. 2018. Vol. 192. P. 103–109.

173. Mauricio D., Alonso N., Gratacos M. Chronic diabetes complications: the need to move beyond classical concepts. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2020. Vol. 31 (4). P. 287–295.

174. Mean platelet volume to lymphocyte ratio as a novel marker for diabetic nephropathy / M. Z. Kocak, G. Aktas, E. Erkus et al. *Journal of College of Physicians and Surgeons Pakistan*. 2018. Vol. 11 (28). P. 844–847.

175. Meta-Analysis of the Association between Fibroblast Growth Factor 23 and Mortality and Cardiovascular Events in Hemodialysis Patients / S. Gao, J. Xu, S. Zhang, J. Jin. *Blood Purif*. 2019. Vol. 47 (1). P. 24–30.

176. Meta-analysis: the efficacy and safety of combined treatment with ARB and ACEI on diabetic nephropathy / F. Ren, L. Tang, Y. Cai et al. *Renal Failure*. 2015. Vol. 4 (37). P. 548–561.

177. Metabolic complications and kidney transplantation: focus on glycaemia and dyslipidaemia / P. Anagnostis, S. A. Paschou, E. Spartalis et al. *Current vascular pharmacology*. 2020. Vol. 3 (18). P. 273–281.

178. Microalbuminuria and its Association with Glycemic Control in Patients with Diabetes Mellitus Type II / S. A. Jiskani, D. Singh, K. A. Meghji et al. *The Professional Medical Journal*. 2020. Vol. 27 (8). P. 1617–1620.

179. Microvascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus / C. Faselis,

A. Katsimardou, K. Imprialos et al. *Current Vascular Pharmacology*. 2020. Vol. 18 (2). P. 117–124.

180. Mistry K. N., Dabhi B. K., Joshi B. B. Evaluation of oxidative stress biomarkers and inflammation in pathogenesis of diabetes and diabetic nephropathy. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. 2020. Vol. 57 (1). P. 45–50.

181. Natural antioxidants in the treatment and prevention of diabetic nephropathy: a potential approach that warrants clinical trials / N. Al-Waili, H. Al-Waili, T. Al-Waili, K. Salom. *Redox Report*. 2017. Vol. 22 (3). P. 99–118.

182. Nephroprotective effects of metformin in diabetic nephropathy / S. Ravindran, V. Kuruvilla, K. Wilbur, S. Munusamy. *Journal of Cellular physiology*. 2017. Vol. 4 (232). P. 731–742.

183. Nieto-Martinez R., Carrera-Boada C. Diabetes mellitus as a risk factor for aging. *Endocrinology & Aging*. 2021. Vol. 2. P. 631–660.

184. Novel model predicts diabetic nephropathy in type 2 diabetes / S. Jiang, J. Fang, T. Yu et al. *American journal of nephropathy*. 2020. Vol. 51 (2). P. 130–138.

185. Pathological significance of urinary complement activation in diabetic nephropathy: a full view from the development of the disease / J. M. Zheng, Z. H. Jiang, D. J. Chen et al. *Journal of Diabetes Investigation*. 2019. Vol. 3 (10). P. 738–744.

186. Perspectives on the role of PTEN in diabetic nephropathy: an update / M. Khokhar, D. Roy, A. Modi et al. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2020. Vol. 57 (7). P. 470–483.

187. Pharmacological management of diabetic nephropathy / V. Papademetrious, S. Alataki, K. Stavropoulos et al. *Current Vascular Pharmacology*. 2020. Vol. 2 (18). P. 139–147.

188. Predictive models of diabetes complications: protocol for a scoping review / R. Ndjaboue, I. Farhat, C.-A. Ferlatte et al. *Systematic reviews*. 2020. Vol. 9. P. 1–14.

189. Profile of diabetic nephropathy at the National Reference General Hospital of N'Djamena (Chad) / I. Hamat, G. M. Abderraman, M. M. Cisse et al. *Pan African Medical Journal*. 2016. Vol. 7. P. 24–193.

190. Prospective effect of ferulic acid on STZ-induced diabetic nephropathy in rats / M.-Y. Qi, X-T. Wang, H.-L. Xu et al. *Food & function*. 2020. Vol. 11 (4). P. 3706–3718.
191. Protective effects of allicin on streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats / H. Huang, Y. Jiang, G. Mao et al. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2017. Vol. 4 (97). P. 1359–1366.
192. Pugliese G., Porta M. Issue focusing: a new topical collection on diabetic nephropathy. *Acta Diabetology*. 2018. Vol. 11 (55). P. 1091–1092.
193. Quercetin liposomes ameliorate streptozotocin-induced diabetic nephropathy in diabetic rats / L. Tang, K. Li, Y. Zhang et al. *Scientific reports*. 2020. Vol. 10 (1). P. 1–8.
194. Relationship between the ApoE gene polymorphism and type 2 diabetes mellitus complications / C. Gao, X. Fu, Q. Chu et al. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2021. Vol. 2 (25). P. 111–115.
195. Rossing P., Persson F., Frimodt-Moller M. Prognosis and treatment of diabetic nephropathy: recent advances and perspectives. *Nephrology Therapies*. 2018. Vol. 1 (14). P. 31–37.
196. Salyha N. O. Effect of glutamic acid and cysteine on oxidative stress markers in rats. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2020. Vol. 92 (6). P. 165–172.
197. Savelieff M. G., Callaghan B. C., Feldman E. L. The emerging role of dyslipidemia in diabetic microvascular complications. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. 2020. Vol. 2 (27). P. 115–123.
198. Serby N. M., Taal M. W. An updated overview of diabetic nephropathy: diagnosis, prognosis, treatment goals and latest guidelines. *Diabetes, obesity and metabolism*. 2020. Vol. 22. P. 3–15.
199. Sharma A. Assessment of complications in type II diabetes mellitus patients. *Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research*. 2020. Vol. 2 (8). P. 34–37.
200. Single-cell RNA profiling of glomerular cells shows dynamic changes in experimental diabetic kidney disease / J. Fu, K. M. Akat, Z. Sun et al. *Journal of*

American Society of Nephrology. 2019. Vol. 4 (30). P. 533–545.

201. Targeting inflammation in diabetic nephropathy: a tale of hope / J. A. Moreno, C. Gomez-Guerrero, S. Mas et al. *Expert Opin Investig Drugs*. 2018. Vol. 27(11). P 917–930.

202. Targeting microRNAs as a therapeutic strategy to reduce oxidative stress in diabetes / G. E. Grieco, N. Brusco, G. Licata et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20 (24). e6358.

203. Tessari P. Nitric oxide in the normal kidney and in patients with diabetic nephropathy. *Journal of Nephrology*. 2015. Vol. 3 (28). P. 257–268.

204. The activity and role of autophagy in the pathogenesis of diabetic nephropathy / W. J. Liu, W. F. Huang, L. Ye et al. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2018. Vol. 10 (22). P. 3182–3189.

205. The antioxidant peptide SS31 prevents oxidative stress, downregulates CD36 and improves renal function in diabetic nephropathy / Y. Hou, Y. Shi, B. Han et al. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. 2018. Vol. 11 (33). P. 1908–1918.

206. The association of obesity and microvascular complications with glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus / R. Bijelic, J. Balaban, S. Milicevic, S. U. Sipka. *Medical Archives*. 2020. Vol. 1 (74). P. 14–17.

207. The content of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-17A and TNF α in the blood of patients with type 2 diabetes after therapy with metformin / K. P. Zak, O. V. Furmanova, V. V. Popova, Ya. A. Sayenko. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2020. Vol. 92 (6). P. 105–112.

208. The pathogenesis of diabetic nephropathy: focus on microRNAs and proteomics / F. Conserva, P. Pontrelli, M. Accetturo et al. *Journal of Nephrology*. 2013. Vol. 5 (26). P. 811–820.

209. The pathological relevance of increased endothelial glycocalyx permeability / M. J. Butler, C. J. Down, R. R. Foster, S. C. Satchell. *The American Journal of Pathology*. 2020. Vol. 4 (190). P. 742–751.

210. The role of smoking as a modifiable risk factor in diabetic nephropathy / M. J. Jose, V. Varkey, R. Chandni et al. *Journal of the Association of Physicians of*

India. 2016. Vol. 7 (64). P. 34–38.

211. Transforming growth factor- β 1 in children with diabetic nephropathy / H. Sawires, O. Botrous, A. Aboulmagd et al. *Pediatric Nephrology*. 2019. Vol. 1 (34). P. 81–85.

212. Treatment of diabetes in older adults: and endocrine society. Clinical Practice Guideline / D. LeRoith, G. J. Biessels, S. S. Braithwaite et al. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2019. Vol. 5 (104). P. 1520–1574.

213. Treatment with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells exerts antidiabetic effects, improves long-term complications and attenuates inflammation in type 2 diabetic rats / S. Yu, Y. Cheng, L. Zhang et al. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019. Vol. 1 (10). P. 333.

214. Type 1 and 2 diabetes mellitus: a review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention / S. Y. Tan, J. L. Mei Wong, Y. J. Sim et al. *Diabetes & Metabolic Syndrome*. 2019. Vol. 1 (13). P. 364–372.

215. Type 2 Diabetes Mellitus and Heart Failure: Innovative Possibilities for Management of Prognosis / Z. D. Kobalava et al. *Kardiologiya*. 2019. № 4 (59). P. 76–87.

216. Tziomalos K., Athyros V. G. Diabetic nephropathy: new risk factors and improvements in diagnosis. *Review of Diabetic Studies*. 2015. Vol. 1-2 (12). P. 110–118.

217. Umanath K., Lewis J. B. Update on diabetic nephropathy: core curriculum 2018. *American journal of kidney disease*. 2018. Vol. 71 (6). P. 884–895.

218. Unraveling the Role of Inflammation in the Pathogenesis of Diabetic Kidney Disease / K. Matoba, Y. Takeda, Y. Nagai et al. *International Journal of Molecular Science*. 2019. Vol. 20 (14). P. 3393.

219. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease / Y.-C. Lin, Y.-H. Chang, S.-Yu Yang et al. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2018. Vol. 117 (80). P. 662–675.

220. Wada J., Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic

nephropathy. *Clinical Science*. 2013. Vol. 3 (124). P. 139–152.

221. Wada T. Clinico-pathological progress in diabetic nephropathy. *Rinsho Byori*. 2016. Vol. 8 (64). P. 954–959.

222. Warren A. M., Knudsen S. T., Cooper M. E. Diabetic nephropathy: an insight into, molecular mechanisms and emerging therapies. *Expert opinion in therapeutic targets*. 2019. Vol. 23 (7). P. 579–591.

223. Werth S., Lehnert H., Steinhoff J. Diabetic nephropathy: current diagnostics and treatment. *Internist*. 2015. Vol. 5 (56). P. 513–519.

224. Yaribeygi H., Atkin S. L., Sahebkar A. Interleukin-18 and diabetic nephropathy: a review. *Journal of cellular physiology*. 2019. Vol. 234 (5). P. 5674–5682.

225. Yu S. M., Bonventre J. V. Acute kidney injury and progression of diabetic kidney disease. *Advances of Chronic Kidney Disease*. 2018. Vol. 2 (25). P. 166–180.

226. Zhang J., Liu J., Qin X. Advances in early biomarkers of diabetic nephropathy. *Revista da Associacao Medica Brasileira*. 2018. Vol. 1 (64). P. 85–92.

227. Zheng Y., Ley Sylvia H., Hu Frank B. Global etiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Reviews Endocrinology*. 2018. Vol. 2 (14). P. 88–92.

ДОДАТКИ

Додаток А

Список публікацій здобувача

1. Експериментальне дослідження цукрового діабету: особливості методик моделювання / І. В. Савицький, В. М. Сарахан, І. А. Кузьменко, Н. В. Якимчук. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2017. № 6. С. 41–45. (Особистий внесок – брав участь в плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті до друку).
2. Correction of endothelial dysfunction among patients suffering from diabetes mellitus / I. V. Savitsky, V. N. Sarakhan, I. V. Miastkivska, V. I. Savitsky. *Journal of Education, Health and Sport*. 2017. Vol. 7 (1). P. 621–632. (Особистий внесок – здобувач особисто провів дослідження, здійснив статистичний аналіз і узагальнення матеріалу).
3. Reproduction of diabetes mellitus` types in an experiment / I. V. Savytskiy, I. A. Kuzmenko, V. M. Sarahan, N. V. Yakymchuk. *World Science*. 2018. Vol. 3, № 1. P. 49–51. (Особистий внесок – брав участь в плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті до друку).
4. Bioflavonoids complex using in the prevention and treatment of diabetes complications / I. I. Hrytsan, I. V. Savytskyi, V. M. Sarakhan et al. *PharmacologyOnLine*. 2020. December, 30. P. 279–283. (Особистий внесок – брав участь в патентному пошуку, проведенні експериментальних досліджень та підготовці статті до друку).

Продовж. дод. А

Апробація результатів дисертації

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня:

1. VII Пленум Українського наукового товариства патофізіологів та науково-практичної конференції, присвячених 110-річчю з дня народження члена-кореспондента АМН СРСР, професора М. Н. Зайка «Інтегративні механізми патологічних процесів: від експериментальних досліджень до клінічної практики» (Полтава, 11-12 жовтня 2018 р., форма участі – публікація тез).

2. Науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 100-річчю з дня народження С. І. Корхова «Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини» (Одеса, 19-20 квітня 2018 р., форма участі – публікація тез).

3. Науково-практична конференція «Патофізіологія нирок та водно-сольового гомеостазу» (Одеса, 15 – 16 лютого 2018 р., форма участі – публікація тез).

4. Всеукраїнська науково-методична конференція, присвячена 25-річчю Медичного інституту Сумського державного університету «Перспективи розвитку медичної науки і освіти» (Суми, 16–17 листопада 2017 р., форма участі – публікація тез).