

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТІ
ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ УКРАЇНИ

СІРМАН Яна Вадимівна

УДК. 616-092.9:616-93:617.731

**ПАТОГЕНЕЗ ДІАБЕТИЧНОЇ РЕТИНОПАТІЇ ТА ОБГРУНТУВАННЯ
ШЛЯХІВ ЇЇ КОРЕКЦІЇ (ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)**

14.03.04 – патологічна фізіологія

22 – Охорона здоров'я

Реферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора медичних наук

Тернопіль – 2022

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в ДП «Український науково-дослідний інститут медицини транспорту» МОЗ України.

Офіційні опоненти:

- доктор медичних наук, професор **Гудима Арсен Арсенович**, Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, завідувач кафедри екстреної та симуляційної медицини;
- доктор медичних наук, професор **Зябліцев Сергій Володимирович**, Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України, професор кафедри патофізіології;
- доктор медичних наук, професор **Грицюк Мар'яна Іванівна**, Буковинський державний медичний університет МОЗ України, проректор з науково-педагогічної роботи та міжнародних зв'язків.

Захист відбудеться 13 січня 2022 р. об 11 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 58.601.01 Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України (46001, м. Тернопіль, майдан Волі, 1).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України за адресою: 46001, м. Тернопіль, вул. Січових Стрільців, 8.

Учений секретар докторської ради Д 58.601.01

Іван КЛІЩ

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Діабетична ретинопатія (ДР) за даними ВООЗ – основна причина зниження зору та сліпоти при цукровому діабеті. Дана патологія є основною причиною інвалідизації по зору у населення економічно розвинених країн і діагностується у 40-85 % пацієнтів, які страждають на цукровий діабет (Вороб'єва І. В., Репкіна М. Ю. 2009.; Abbate M. et al. 2011; Вороб'єва І. В., Гігінешвілі Д. Н.. 2012; Аметов А. С. та ін., Зубков А. А. 2014). Варто зауважити, що навіть при компенсації вуглеводного обміну продовжується розвиток ДР. Важливим фактором розвитку ретинопатії при цукровому діабеті є не лише гіперглікемія, а й артеріальна гіпертензія (Шестакова М. В., Шамхалова М. Ш. 2009.; Wright A. D., Dodson P. M., 2010.; American Diabetes Association, 2011; Delano F. A. et al., 2011; Porta M. et al., 2011). На сьогоднішній день доведена ключова роль дисфункції ендотелію у виникненні та прогресуванні діабетичної ретинопатії (Гаврилова Н. А., Тищенко О. Е., 2011). Визначено, що початковими морфологічними ознаками досліджуваного патологічного процесу є проліферація ендотеліоцитів, потоншення базальної мембрани та втрата перицитів, що в свою чергу призводить до виникнення аневризм та порушення діаметру капілярів судин та гемодинаміки (Касаткіна С. Г., Касаткін С. Н. 2011; Вороб'єва І. В., Гігінешвілі Д. Н., 2012;). Доведено, що саме ендотеліоцити першими «приймають удар» гіперглікемії, глюкозотоксичності та дисліпідемії і під його впливом починають синтезувати атерогенні фактори (Гаврилова Н. А. і др., 2015). Прослідковується збільшення проникності стінки судин та порушення їх еластичності, що призводить до виникнення геморагій та ексудатів. Порушується транскapілярний транспорт, що в свою чергу призводить до ішемії сітківки (Колединцев М. Н., Верзин Р. А., 2015).

За сучасними уявленнями, пізні судинні ускладнення не є фатальними в разі своєчасного початку та адекватного проведення профілактичних і лікувальних заходів. Для цього необхідно адекватно спрогнозувати перебіг захворювання, щоб мати змогу уже на ранніх етапах підібрати ефективну корекцію патогенетичних ланок. Важливе значення має раннє виявлення і прогнозування перебігу мікроангіопатій та своєчасний вплив на модифікуючі фактори ризику (Петруня А. М. та ін., 2012; Іванова Н.В. та ін, 2014).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом комплексних клініко-лабораторних досліджень, здійснених у ДП «Український науково-дослідний інститут медицини транспорту МОЗ України» в межах виконання НДР «Удосконалення профілактики та лікування основних екозалежних та професійно обумовлених захворювань на основі вивчення особливостей їх етіології та патогенезу» (№ державної реєстрації 0116U008822). Фрагменти цієї роботи, присвячені визначенню патофізіологічних механізмів розвитку експериментальної діабетичної ретинопатії та розробці патогенетично обґрунтованих методів її корекції. Дисертант була співвиконавцем зазначеної теми.

Мета дослідження: з'ясувати патогенетичні ланки ускладнень експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету, зокрема діабетичної ретинопатії і дисфункції ендотелію судин та їх корекції.

Завдання дослідження.

1. Дослідити дисфункцію ендотелію при діабетичній ретинопатії на тлі експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету.
2. Дослідити динаміку рівнів ендотеліну-1, фактору Віллебранда та асиметричного диметиларгініну, як маркерів ендотеліальної дисфункції у патогенезі стрептозотоцинової діабетичної ретинопатії.
3. Дослідити динаміку дисбалансу вазоконстрикторно-вазодилататорного потенціалу під час розвитку змодельованого патологічного процесу.
4. Визначити інформативність дослідження зміни активності ендотеліальної та індукцибельної NO-синтази та рівня S-нітрозотіолів для визначення шляху синтезу оксиду нітрогену у патогенезі стрептозотоцинової діабетичної ретинопатії.
5. Встановити рівень 2,3 діфосфогліцерату еритроцитів як маркера гіпоксії при експериментальній діабетичній ретинопатії.
6. З'ясувати порушення про- і антиоксидантної системи у патогенезі змодельованої діабетичної ретинопатії.
7. Вивчити динаміку фактора росту судин у патогенезі стрептозотоцинової діабетичної ретинопатії.
8. Визначити прогностичні маркери тяжкості перебігу стрептозотоцинової діабетичної ретинопатії.
9. Проаналізувати роль інтерлейкіну 1 β у патогенезі експериментальної діабетичної ретинопатії.
10. Дослідити корекцію патогенетичних ланок змодельованої діабетичної ретинопатії за допомогою введення метформіну, афліберцепту, L-карнітіну, бромфенаку, розчину L-аргініну та цитиколіну.
11. Створити математичну модель виявлення результативних прогностичних маркерів розвитку діабетичної ретинопатії.

Об'єкт дослідження: патогенетичні ланки ускладнень експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету, зокрема діабетичної ретинопатії та ендотеліальної дисфункції.

Предмет дослідження: експериментальна діабетична ретинопатія, дисфункція ендотелію, зміни маркерів функціонального стану ендотелію: фактора Віллебранда, ендотеліну-1, S-нітрозотіолів, ендотеліальної NO-синтази, індукцибельної NO-синтази, асиметричного диметиларгініну; зміни маркерів гіпоксії та окислювального стресу: 2,3 діфосфогліцерату еритроцитів, малонового діальдегіду, дієнових кон'югатів, пероксидази; зміни прозапального інтерлейкіну, фактора росту судин, глюкози, дослідження коригуючих засобів: метформіну, афліберцепту, L-аргініну, цитиколіну, L-карнітіну, бромфенаку.

Методи дослідження: експериментальні (для моделювання стрептозотоцинової діабетичної ретинопатії на експериментальних тваринах), патофізіологічні (для дослідження патогенезу змодельованого ускладнення цукрового діабету), біохімічні (для визначення змін показників дисфункції ендотелію, гіпоксії, окислювального стресу, запалення та гіперглікемії), гістологічні (для дослідження особливостей структурних змін ока при

стрептозотоциновій діабетичній ретинопатії), математико-статистичні (для обробки одержаних даних).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше надано комплексну оцінку розвитку ендотеліальної дисфункції при експериментальній діабетичній ретинопатії та обґрунтований спосіб її корекції.

Вперше було дане експериментальне підтвердження доцільності обраних біохімічних показників як маркерів тяжкості досліджуваної патології

Вперше встановлено послаблення вазодилатаційного процесу на тлі розвитку експериментальної діабетичної ретинопатії, про що свідчить зменшення вмісту S-нітрозотіолів.

Вперше показано, що в патогенезі стрептозотоцинової діабетичної ретинопатії значно підвищується вазоконстрикторний потенціал судин, про що свідчить значне підвищення ендотеліну-1 у тварин.

Доведено, що розвиток експериментальної діабетичної ретинопатії негативно впливає на функціональний стан судин на кожному із етапів дослідження. Вперше виявлено значні зміни рівня фактора Віллебранда та АДМА як маркерів ендотеліальної дисфункції в динаміці розвитку патологічного процесу.

Вперше проведено дослідження шляхів синтезу оксиду нітрогену при експериментальній ДР та роль індукцйбельної NO-синтази у цьому процесі.

Вперше поетапно проаналізовано розвиток гіпоксії на основі динаміки рівня 2,3 діфосфогліцерату еритроцитів у крові щурів при моделюванні діабетичної ретинопатії.

Вперше визначено дисбаланс між про- та антиоксидантною системою під час розвитку експериментальної стрептозотоцинової діабетичної ретинопатії.

Вперше досліджено динаміку та роль фактору росту судин для визначення ступеню тяжкості змодельованого патологічного процесу.

Вперше доведена роль прозапального інтерлейкіну у розвитку дисфункції ендотелію при стрептозотоциновій діабетичній ретинопатії.

Вперше запропоновано патогенетично обґрунтований спосіб корекції, де експериментальним шляхом було підібрано оптимальне поєднання введення метформіну, афліберцепту, розчину L-аргініну та цитиколіну.

Вперше розроблена математична прогностична модель розвитку стрептозотоцинової діабетичної ретинопатії, яка ґрунтується на аналізі біохімічних показників крові на ранніх етапах експерименту. Отримане рівняння логістичної регресії має такий вигляд:

$$G(z) = \frac{e^{(-642,032+44,993 \cdot x_1+35,443 \cdot x_2+2,987 \cdot x_3)}}{1 + e^{(-642,032+44,993 \cdot x_1+35,443 \cdot x_2+2,987 \cdot x_3)}}$$

Для отримання відсоткового значення ймовірності важкості розвитку експериментальної діабетичної ретинопатії (у межах від 0-100 %), використовуючи отриману функцію логістичної регресії, потрібно помножити отримане значення функції $G(z)G(z)$ на 100%.

Вперше встановлена результативність комплексного аналізу рівня 2,3 діфосфогліцерату еритроцитів разом з маркерами функціонального стану

ендотеліоцитів (фактором Віллебранда та ендотеліном-1) на 30-у добу для прогнозування подальшого перебігу досліджуваного патологічного процесу.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати розширюють уявлення про патогенез експериментальної діабетичної ретинопатії, що є безумовно корисним, як для науковців в галузі патологічної фізіології, так і для практикуючих лікарів. Одержані результати дають можливість патогенетично обґрунтувати корекцію стрептозотоцинової діабетичної ретинопатії та профілактику можливих ускладнень даної патології. Результати досліджень розкривають патогенез експериментальної діабетичної ретинопатії і створюють передумови до розробки рекомендацій з метою запобігання зазначених ускладнень. Позитивний коригуючий ефект від задіяних в ході експерименту складових корекції є суттєвим підґрунтям для подальших досліджень, як функціонального стану судин, так і профілактики діабетичної ретинопатії як складової частини ускладнень цукрового діабету. Розроблена математична прогностична модель розвитку діабетичної ретинопатії, яка ґрунтується на аналізі біохімічних показників крові на ранніх етапах експерименту.

Отримані результати впроваджено у навчальний процес і науково-дослідну роботу на кафедрах патологічної фізіології Івано-Франківського національного медичного університету, Харківського національного медичного університету, Національного фармацевтичного університету, Буковинського державного медичного університету, Одеського національного медичного університету, Львівського національного медичного університету, Львівського медичного університету, а також в науково-дослідну роботу ДП Український науково-дослідний інститут медицини транспорту МОЗ України.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно проведено інформаційно-патентний пошук, вибір обсягів та методів дослідження, обґрунтування схем дослідження. Автор самостійно проводив моделювання експериментальної діабетичної ретинопатії, формував групи дослідження, підбір та обґрунтування засобів корекції, експериментальні дослідження, проводив аналіз та узагальнення отриманих результатів, сформулював основні положення та висновки роботи. Автором написано всі розділи дисертації, оформлено наукові публікації і автореферат. У всіх наукових працях, що містять результати дисертаційних досліджень, використаний матеріал, який автор одержав під час виконання роботи.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації оприлюднені на: науково-практичній конференції «Шевальовські читання 19» (Запоріжжя 2019); науково-практичній конференції XVIII–і читання В.В. Підвисоцького (Одеса, 2019); науково-практичній конференції з міжнародною участю Галицькі читання «Сучасні уявлення щодо патогенезу запалення: місцеві та системні механізми». (Івано-Франківськ 2019); VIII Національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю (Одеса, 2020), XII науково-практичній конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм» (Тернопіль, 2020); II науково-практичній інтернет-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція» (Харків, 2019); науково-практичній конференції з

міжнародною участю «Філатовські читання – 2019» (Одеса, 2019); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Фізіологічні та клінічні аспекти ендокринної патології» (Яремче, 2019); науково-практичній конференції «Актуальні проблеми експериментальної та клінічної біохімії» (Харків, 2019).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 36 наукових робіт, з них 10 статей у фахових виданнях України (1 – у виданні, що індексується у Scopus), 16 – в іноземних періодичних виданнях (3 – у виданнях, що індексуються у Scopus), 11 публікацій у матеріалах наукових конференцій.

Структура і обсяг дисертації. Дисертація викладена на 373 сторінках комп'ютерного тексту і складається з анотації, вступу, огляду літератури, (опису) матеріалів і методів, 4-х розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел, що містить 737 найменувань, та додатків. Дисертація ілюстрована 13 таблицями та 90 рисунками. Список використаних літературних джерел та додатки викладено на 93 сторінках.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проводилося на 420 статевозрілих білих щурах-самцях лінії Вістар масою 180-200 г. Вивчали особливості діабетичної ретинопатії на різних етапах розвитку експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету (на 30-у, 60-у та 180-у добу) та оптимізацію методів її корекції.

Упродовж місяця до початку та під час експерименту тварин утримували у віварії при сталій температурі 20-21⁰ С з вільним доступом до їжі та води, в окремих клітках та природною зміною світла і темряви (по розміру достатніх для вільного переміщення), експерименти проводилися у жовтні–грудні (за для виключення дії статевих гормонів), з дотриманням положень Директиви ЄС № 609 (1986) та наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р.

Відповідно до задач тварини були розподілені на 7 груп:

1-а група – 60 інтактних тварин;

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

3 група— 60 тварин, у яких моделювали діабетичну ретинопатію з подальшою корекцією гіперглікемії.

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

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

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

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

Дослідження проводили згідно з «Правилами виконання робіт з використанням експериментальних тварин», затверджених Наказом МОЗ України № 249 від 01.03.2012 та Законом України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (зі змінами від 15.12.2009 р. та від 16.10.2012 р.). Висновок комісії з етичних питань та біоетики ДП «Український науково-дослідний інститут медицини транспорту МОЗ України» засвідчує відповідність проведених досліджень нормам біоетики (акт № 9/15 від 08.11.2021 р.).

Моделювання патологічного процесу, досліджувані показники та способи корекції

Стрептозотоциновий цукровий діабет та діабетичну ретинопатію моделювали за допомогою інтраперитонального введення стрептозотоцину (Sigma, США) розчиненому в 0.1 М цитратному буфері з рН 4,5 (Полторак В.В. і др., 1991; Пасечникова Н.В., Мороз О.А., 2015). Дозу стрептозотоцину 55 мг/кг маси тварини розділили на два введення. Введенню стрептозотоцину передувала високожирова дієта протягом 28-и діб. (Кайдаш О. А. та ін., 2020)

Авторами даної методики доведено, що годування щурів дієтою з високим вмістом жирів (55 % калорій - у 100 г корму с з високим вмістом жирів було 26 г кокосового масла, 2 г холестерину и 72 г стандартного корму для лабораторних тварин) і введенням стрептозотоцину адекватно моделює патогенез стрептозотоцинового цукрового діабету (Кайдаш О. А. та ін., 2020).

Дози препаратів:

Гіпоглікемічний препарат – метформін (Merck Sante, виробництво Франція) – у дозі 300 мг/кг маси у питтєвій формі (Байрашева В. К. та ін., 2016) на 0,9 % розчині натрія хлориду через шприц з внутрішньошлунковим зондом щоденно, протягом усього експерименту.

Введення розчину L-аргініну, який є донатором NO, (СІМЕСТА, виробництво Китай, стандарт якості USP32), здійснювалось шляхом внутрішньошлункового введення розчину L-аргініну на 0,9 % розчині натрію хлориду в дозі 500 мг/кг (Покровський М. В. та ін., 2008) через шприц з внутрішньошлунковим зондом. Об'єм розчину залежав від маси тварини і не перевищував 1 мл. Препарат вводили 1 раз на добу вранці, щоденно протягом 10 днів (Покровський М. В. та ін., 2008). Введення препарату повторювали щомісячно, протягом усього експерименту. Враховуючи те, що L-аргінін - амінокислота, яка є субстратом для NO-синтази (фермента, який каталізує синтез оксиду азоту. Синтез оксиду азоту із L-аргініну є ключовим моментом у підтримці фізіологічного функціонування ендотелію (Лишневська В. Ю. та ін., 2011).

Афліберцепт (anti-VEGF терапію) вводили у формі субкон'юнктивальних ін'єкцій у дозі 0,08 мл (25 мг/мл) з інтервалом 1 введення кожні 30 діб. Вибір препарату обумовлений тим, що одним із основних факторів розвитку діабетичної ретинопатії є гіпоксія та в подальшому – неоваскуляризація. Важливим фактором розвитку неоваскуляризації є надлишкова продукція вазопроліферативного фактору, який збільшує проникність судинної стінки. В свою чергу афліберцепт зв'язує судинний ендотеліальний фактор росту судин, чим попереджає процеси

неоваскуляризації та знижує розвиток патологічної проникності судинної стінки (Туманова О. В. та ін., 2019).

Бромфенак – інстиляції 0,09 % розчину очних крапель 1 раз на добу (Павлова О. Н. та ін., 2020) щоденно, на усіх етапах дослідження. Даний препарат – похідний фенілоцтової кислоти, має у своїй формулі атом бром, що підвищує його ліпофільність, анальгезуючу та протизапальну активність (за рахунок підвищеної афінності до ЦОГ 2) (Максимов М. Л. та ін., 2021). У ряді досліджень встановлено, що бромфенак в 3,7 раза більш ефективний у порівнянні з диклофенаком, в 6,5 раза порівняно з амфенаком і в 18 разів порівняно з кеторолаком. Встановлено, що бромфенак визначається у рогівці, райдужці, сітківці та внутрішньоочній рідині, судинній оболонці та цилиарному тілі протягом 24-х годин після закапування, що обумовлює доцільність його введення 1 раз/добу (Спірідонов Е. А., 2015).

L-карнітін (“Sigma”, США) вводили у формі водного розчину через шприц з внутрішньошлунковим зондом у дозі 25 мг/100 г маси тварини (Биков І. Л., 2004; Дзугкоєв С. Г. та ін., 2012) щоденно, протягом 30-и діб. Вибір препарату обґрунтований даними, щодо вираженого захисного впливу цього флавоноїду на тіолову систему сітківки при експериментальному цукровому діабеті та його здатності стабілізувати ферменти антиоксидантного захисту та впливом на систему глутатіону (Пасічникова Н. В., Мороз О. А., 2015).

Цитиколін - 81,8 мг/кг (0,33 мл/кг) вводили внутрішньом’язово 1 раз на добу (Savytskyi I. V. et al., 2016) щоденно, протягом 30-и діб. Вибір препарату обґрунтований доведеним в ряді досліджень ретинопротекторним впливом даного препарату (Венгер Л. В. та ін., 2012).

Препарати, використані у роботі вводили в дозуванні згідно інструкції та відповідно до коефіцієнту видової чутливості.

Виведення тварин із експерименту проводилося у три етапи:

- 1-й етап дослідження – 30-а доба після моделювання цукрового діабету(завершенням моделювання цукрового діабету рахували 30-у добу після введення другої дози стрептозотоцину);

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

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

Тварин виводили з досліду шляхом декапітації у ранковий час за допомогою гільотини. Здійснювали забір крові з ретроорбітального венозного сплетіння, яке лежить в орбіті позаду очного яблука. Прокол здійснювали круговими рухами скляною піпеткою з відтягнутим капіляром, вістря якого сточене під кутом 45 °. Проколювали кон’юнктивальний мішок у медіальному куті ока між очним яблуком та орбітою. Після проколу піпетку вводили на глибину до 2-4 мм за очне яблуко. Контроль потрапляння у венозне сплетіння – наповнення капіляра піпетки кров’ю. При недостатньому об’ємі забраної крові здійснювали забір методом пункції серця (Д’якон А. В. та ін., 2013; Задорожна Г. О. та ін., 2019).

Активність ендотеліальної та індукцибельної синтази оксиду нітрогену визначали спектрофотометричним методом за приростом концентрації нітритів та нітратів у реакційній суміші, що містить 50мМ KH_2PO_4 (рН 7,0), 1 мМ MgCl_2 , 1мМ НАДФН_2 и 2мМ CaCl_2 (для визначення активності ендотеліальної NO

синтази) та 4мМ ЕДТА (для зв'язування ендogenous кальцію при вимірюванні активності індукцибельної NO-синтази) протягом 15 хвилин при температурі 37 ° С. Принцип методу: NO-синтаза каталізує перетворення L-аргініну на цитрулін і оксид нітрогену (NO), NO –нестабільна молекула, яка перетворюється на нітрит і нітрат. Вміст нітритів і нітратів визначали за методом L. Green за допомогою реактиву Грісса. Вміст нітритів пропорціональний активності NO-синтаз (Ковальова О. М. та ін., 2007; Пархоменко А. Н. та ін. 2014).

Визначення вмісту дієнових кон'югатів у сироватці крові проводилося спектрофотометричним методом (Габрилян Н. І. та ін., 1983). Враховувалось те, що для первинних продуктів вільнорадикального окислення, одним із яких є дієнові кон'югати, характерне поглинання в ультрафіолетовій області спектра з максимумом при 220-230 нм. Коефіцієнт мілімолярної екстинції дієнових кон'югатів – 24,4 ммоль⁻¹ см⁻¹ (Гаврилов Б. В., Мишкорудна М. І., 1983).

Визначення вмісту в сироватці крові щурів ТБК-активних продуктів (малонового діальдегіду (МДА)). Визначали спектрофотометричним методом (Габрилян Н. І. та ін., 1983). Вимірювали концентрацію малонового діальдегіду (МДА), який при нагріванні взаємодіє з 2-тіобарбітуровою кислотою, утворюючи пофарбований комплекс з максимумом поглинання при $\lambda = 533$ нм

У пофарбованих розчинах записували спектр поглинання ТБК-активних продуктів спектрофотометрі СФ-46. Вимірювали $\Delta E_{535-580}$ та розраховували кількість МДА, приймаючи коефіцієнт молярної екстинції, рівним $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. $A_{\text{мда}} (\text{мкМ/л}) = (D_0 - D_x) \cdot 6 / 0,0156$ (Гаврилов Б. В., Мишкорудна М. І., 1983).

Визначення рівня пероксидази проводилося спектрофотометричним методом (Попов Т., Нейковська Л., 1971).

Рівень 2,3 дифосфогліцерату еритроцитів визначали спектрофотометричним методом (Мранова І. С., 1975).

Рівень фактора Віллебранда визначали імуноферментним методом по ристоцитиновому часі (Харламова У. В., Ільчова О. Е., 2012; Баркаган З. С., Момот А. П., 2001).

Вміст S-нітрозотіолів, які, як відомо, є стабільними метаболітами NO, визначали флюориметричним методом (Габрилян Н. І. та ін., 1983; Ковальова О. М. та ін., 2007;) на приладі Hitachi-M (Японія) (Marzinzig M., Nussler A. K. et al.), Принцип методу. Конверсія нітросо групи S-нітрозотіолів у нітрити (за допомогою хлориду ртуті) та подальше кислотокаталізоване нітрозотування 2,4-діамінонафталіну. Перед цим NO₂ має бути повністю видалений за допомогою амонію сульфату (редукує NO₂ до N₂ у кислих умовах). Проведення методу. Розчином амонію сульфату з концентрацією 0,1мМ/л осаджують нітрити з розведеної фізрозчином у 7 разів сироватки або гомогенатів тканин. Центрифугували, До 50 мкл надосадової рідини додавали 200мкл реакційної суміші, що складається з 1 частини 1,1мМ HgCl₂ і 4 частин 0,05 г/л діамінонафталіна 0,62М HCl, інкубували 10 хвилин у темряві при кімнатній температурі. Реакцію зупиняли додаванням 20мкл 2,7М NaOH, Вимірювали флюорисценцію при 360/450 нм. Розрахунок проводили по калібрувальної кривої, побудованої з використанням різних концентрацій відновленого глутатіону (від

0,15 до 10,0 мкмоль/л відновленого глутатіону в 1М HCl). З відновленого глутатіону отримували нітрузо-глутатіон шляхом інкубування з нітритом натрію (10,0 мкмоль/л) при кімнатній температурі.

Визначення вмісту ендотеліну-1, який є маркером вазоконстрикції (Реутов В. П. та ін., 1997) проводили імуноферментним методом в сироватці крові за допомогою наборів реагентів фірми DRG (Німеччина) (Габрилян Н. І. та ін., 1983).

Аналіз домінування вазоконстрикторного чи вазодилатаційного потенціалу виконували шляхом визначення співвідношення рівня ендотеліну-1 до S-NO.

Рівень глюкози у крові експериментальних тварин визначали глкозооксидазним методом за допомогою набору реагентів фірми «Філісит-Діагностика (Дніпро).

Рівень фактора росту ендотелію судин (VEGF) у сироватці крові щурів визначали імуноферментним методом за допомогою наборів реактивів фірми «Вектор БЕСТ» (РФ) (Ткаченко А. С., 2013).

Рівень інтерлейкіну 1 В аналізували імуноферментним методом за допомогою наборів «Вектор БЕСТ» (РФ) (А-8774 та А-8766)

Інтерлейкін 1 В і VGEF мають низьку видову специфічність, що дозволяє (в умовах наявності контрольної групи) використовувати для їх визначення набори, призначені для людини.

Вміст АДМА визначали за допомогою рідинного хроматографа LC 5000 (фірма INGOS, Чехія), довжина хвилі 340 нм, в ізократичному режимі. Для твердофазної екстракції (очистка та концентрування) були використані катриджі Absolut Nexus (Variun) (Tarlink T., 2002).

Гістологічне дослідження: після виведення щурів з експерименту проводили енуклеацію. Одне очне яблуко фіксували 24 години в 4 % розчині параформальдегіду, потім одержані матеріали проводили через спирти зростаючої концентрації і заливали у целоїдин за загальноприйнятою методикою. З отриманих блоків виготовляли гістологічні зрізи 7-9 мкм, які фарбували гематоксиліном-еозином. Отримані препарати досліджували під світловим мікроскопом і визначали структурні зміни в утвореннях очного яблука.

Статистична обробка отриманих результатів

Для виявлення зміни у досліджуваних показниках між різними групами та на різних етапах нами були використані параметричні статистичні методи, в основу яких покладено оперування з параметрами статистичного розподілу (середнім та дисперсією).

Використані методи розраховані на нормально розподілені дані, тому ми виконали перевірку всіх даних на нормальність за допомогою критерію асиметрії та ексцесу Є.І. Пустильника. Всі дані, які ми розглядаємо, виявилися нормально розподіленими, тому можна попарно порівнювати середні значення вибірок. Зауважимо, що в подальших порівняннях ми виконували порівняння у незалежних вибірках. Це були порівняння між різними групами тварин, або порівняння між тією є ж групою тварин (але так як у вибірках не має відповідності між тваринами, то вони теж будуть незалежними). Перш ніж порівнювати середні значення двох вибірок, з'ясовували, чи однорідні в них

дисперсії. Для цього виконали перевірку на гомоскедестичність (однорідність дисперсій).

Статистичні гіпотези були такі:

H_0 : дисперсія у групі 1 не відрізняється від дисперсії у групі 2.

H_1 : дисперсія у групі 1 більша за дисперсію у групі 2.

Гіпотези у критерії напрямлені, тому і критерій односторонній. У всіх подальших розрахунках ми обрали стандартний рівень значущості $= 0,05 = 0,05$.

Порівняння середніх виконували за допомогою t -критерію Стьюдента. При порівнянні середніх напрямлені гіпотези були такі:

H_0 : середнє групи 1 не відрізняється від середнього групи 2.

H_1 : середнє групи 1 більше за середнє групи 2.

Для прийняття рішення абсолютне значення обчисленого t порівнювали з одностороннім критичним. Якщо $|t_{\text{емп}}| < t_{\text{кр}} |t_{\text{емп}}| < t_{\text{кр}}$, то нульову гіпотезу відхилити не можна. Тут аналогічно можна робити висновок і по p -значенню.

Всі тести виконані у статистичному пакеті PASW Statistics 18. Використовували процедуру t -критерію для незалежних вибірок, яка відразу виконує порівняння дисперсій і середніх.

У подальших тестах відмічали, чи відмінні середні значення. Результати t -тесту дають відповідь про статистичну вірогідність середніх значень. Крім цього розраховували відсоток відхилення досліджуваних показників порівняно з контрольною групою, в динаміці та в ході корекції. але вони не дають можливості точно вимірювати різницю між середніми значеннями. Зауважимо, що ця різниця є досить умовною. Цю різницю ми розраховували у відсотках, тобто відсоткова різниця між середніми значеннями 1-ї та 2-ї групи була рівна $\left(\frac{-20,604}{104,79}\right) \cdot 100\% = 19,66\% \left(\frac{-20,604}{104,79}\right) \cdot 100\% = 19,66\%$

Для визначення статистичної достовірності між незалежними сукупностями величин відповідних параметрів у кожній групі, що наведені у вигляді бокс-плотів в ілюстраціях був застосований тест Манна-Уїтні. Значення $p < 0,05$ було обране у якості критерію достовірності.

Аналіз математичної моделі. Розрахунки параметрів логістичної регресії та характеристик, які описують адекватність моделі, проведено в статистичному пакеті PASW Statistics 18. У якості функції втрат використовували метод максимальної правдоподібності, статистичну значущість моделі було оцінено по декількох критеріях Хі-квадрат та Хосмера-Лемешева.

У якості змінних-факторів були використані три наступні:

1. $x_1 x_1$ - 2,3 дифосфоглицерат еритроцитів;
2. $x_2 x_2$ - Ендотелін-1;
3. $x_3 x_3$ - Фактор Віллебранда.

Також були побудовані кореляційні поля з лініями тренду, на яких наявні коефіцієнти детермінації. Також побудовані графіки які ілюструють характер зв'язку (прямий чи обернений).

При сумісній появі двох величин у результаті проведення експерименту дослідник має підстави для встановлення певної залежності між ними, зв'язку.

Результати дослідження та їх обговорення. У результаті проведеного дослідження доведено порушення структурно-функціонального стану ендотелію при експериментальній діабетичній ретинопатії, про що свідчить підвищення рівня фактора Віллебранда (рис. 1), асиметричного диметиларгініну (АДМА) (рис. 2) та ендотеліну-1 (рис. 3) у 2-й групі ($p < 0,001$) уже на першому етапі дослідження. На 60 –у добу спостерігається більш виражене збільшення рівня досліджуваних показників. Результати третього етапу підтверджують прогресування ендотеліальної дисфункції: порівняно з інтактною групою підвищення рівню фактору Віллебранда, АДМА та ендотеліну-1 максимально виражене на 180-у добу дослідження.

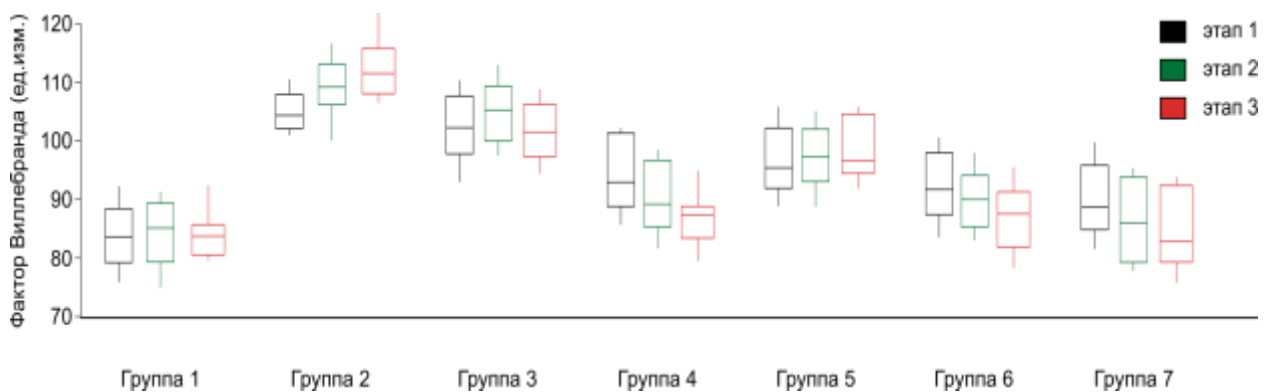


Рисунок 1 – Рівень фактора Віллебранда у крові експериментальних тварин зі змодельованою діабетичною ретинопатією та при різних способах її корекції на 30-у, 60-у та 180-у добу. Бокс плоти ілюструють розподіл величин рівня досліджуваного показника в усіх групах експерименту на кожному із етапів дослідження (n=20)

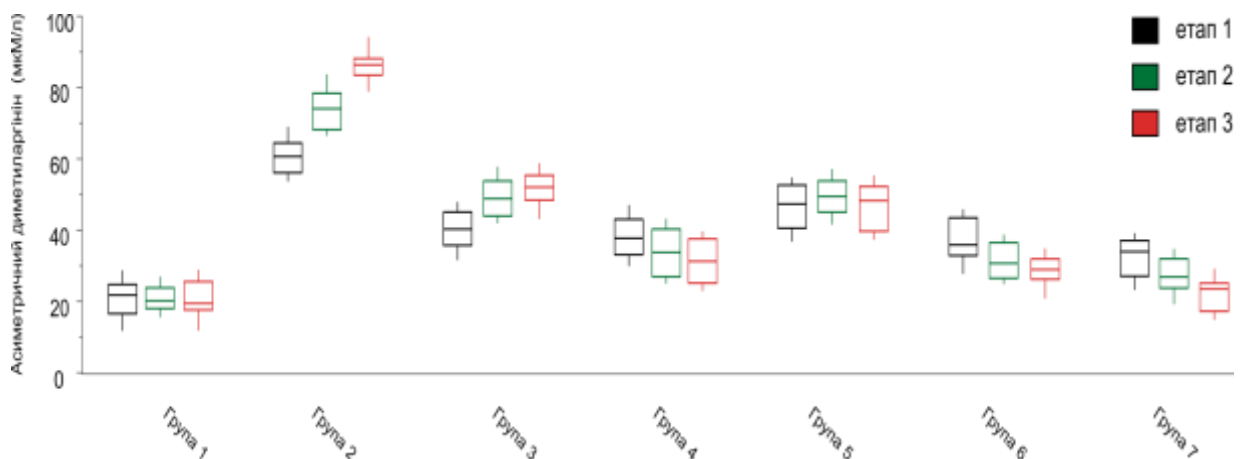


Рисунок 2 – Рівень асиметричного диметиларгініну у крові експериментальних тварин зі змодельованою діабетичною ретинопатією та при різних способах її корекції на 30-у, 60-у та 180-у добу. Бокс плоти ілюструють розподіл величин рівня досліджуваного показника в усіх групах експерименту на кожному із етапів дослідження (n=20)

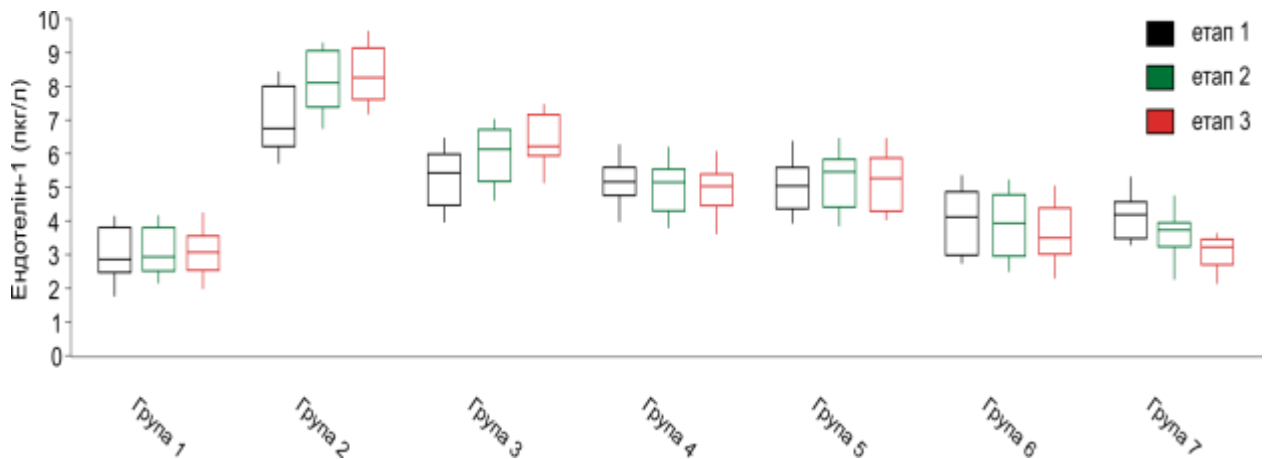


Рисунок 3 – Рівень ендотеліну-1 у крові експериментальних тварин зі змодельованою діабетичною ретинопатією та при різних способах її корекції на 30-у, 60-у та 180-у добу. Бокс плоти ілюструють розподіл величин рівня досліджуваного показника в усіх групах експерименту на кожному із етапів дослідження (n=20)

Також встановлено виражене порушення балансу вазокостриції / вазодилатації у бік переважання вазоконстрикторно потенціалу, про що свідчить зниження вмісту S-нітрозотіолів (рис. 4) разом із підвищенням рівня ендотеліну-1.

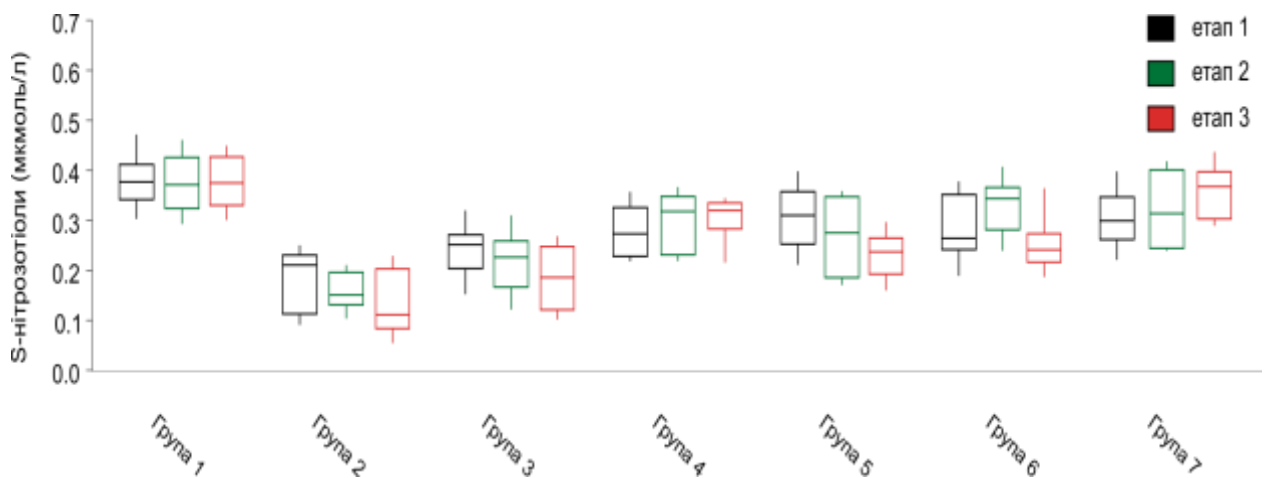


Рисунок 4 – Вміст S-нітрозотіолів у крові експериментальних тварин зі змодельованою діабетичною ретинопатією та при різних способах її корекції на 30-у, 60-у та 180-у добу. Бокс плоти ілюструють розподіл величин рівня досліджуваного показника в усіх групах експерименту на кожному із етапів дослідження (n=20)

При аналізі вищезазначених маркерів у 3-й групі, тварини якої отримували лише метформін, підтверджено, що корекція досліджуваного ускладнення цукрового діабету лише гіпоглікемічним препаратом навіть при довготривалому введенні не коригує розвиток ендотеліальної дисфункції ($p < 0,001$).

Виявлено, що додавання у корекції до гіпоглікемічних препаратів афліберцепта та розчину L-аргініну значно ($p < 0,001$) покращує стан ендотелію, але не вирішує проблему в повному обсязі. У 4-й групі, на 30-у добу дослідження патологічне підвищення рівня показників ЕД менш виражене порівняно з даними попередніх груп на цьому етапі, на 60-у добу також суттєво проявляється тенденція щодо нормалізації рівня маркерів у даній групі. На 3-ому етапі (180-а доба) зберігається позитивна тенденція щодо нормалізації рівня показників. Порівняно з даними 3-ої групи, у якій використовували гіпоглікемічну терапію, застосування донатора оксиду нітрогену є результативнішим, але не досягає значень інтактної групи. Прослідковується, що корекція змодельованого патологічного стану шляхом зниження гіперглікемії, введення афліберцепта та бромфенаку (група № 5) позитивно впливає на нормалізацію рівня маркерів функціонування ендотелію ($p < 0,001$), але ефект є менш вираженим, ніж у наступних групах. Виявлено, що у щурів у яких моделювали діабетичну ретинопатію з подальшою корекцією гіперглікемії, введенням афліберцепта, L-карнітину та бромфенаку (група № 6) зниження патологічно підвищеного рівня маркерів ендотеліальної дисфункції є більш вираженим порівняно з даними 3-ї-5-ї груп, що свідчить про доцільність даного способу корекції.

Встановлено, що максимально результативним виявився спосіб корекції у 7-й групі експерименту в якій здійснювали корекцію гіперглікемії, введення афліберцепта, розчину L-аргініну та цитиколіну – отримано дані не лише про нормалізацію рівнів маркерів ендотеліальної дисфункції, а і про відновлення фізіологічного стану показників судинного тонуусу (вазоконстрикції та вазодилатації). Отримані дані свідчать, що ефективність запропонованого способу корекції виявляється уже на 30-у добу та поетапно збільшується, сприяючи нормалізації показника функціонального стану ендотелію.

Доведено роль дисфункції ендотелію у розвитку експериментальної діабетичної ретинопатії. Розроблено математична модель прогнозу досліджуваного патологічного стану, яка ґрунтується на аналізі біохімічних показників крові на ранніх етапах експерименту.

Отримане рівняння логістичної регресії має такий вигляд

$$G(z) = \frac{e^{(-642,032+44,993 \cdot x_1+35,443 \cdot x_2+2,987 \cdot x_3)}}{1 + e^{(-642,032+44,993 \cdot x_1+35,443 \cdot x_2+2,987 \cdot x_3)}}$$

Для отримання відсоткового значення ймовірності подальшої тяжкості розвитку діабетичної ретинопатії (у межах від 0-100 %), використовуючи отриману функцію логістичної регресії, потрібно помножити отримане значення функції $G(z)G(z)$ на 100 %.

Доведено інформативність маркерів дисфункції ендотелію – фактора Віллебранда та ендотеліну-1 у прогнозуванні подальшого розвитку діабетичної ретинопатії. Встановлено результативність комплексного аналізу рівня 2,3 діфосфогліцерату еритроцитів разом із зазначеними маркерами функціонального стану ендотеліоцитів на 30-у добу для прогнозування подальшого перебігу досліджуваного патологічного процесу. Отримані результати свідчать про розвиток гіпоксії уже на 30-у добу розвитку експериментальної діабетичної

ретинопатії з подальшим прогресуванням патологічних змін на 60-у та 180-у добу дослідження, про що свідчить зниження рівня 2,3 діфосфогліцерату еритроцитів у 2-й групі ($p < 0,001$), максимально виражене на 3-му етапі.

При аналізі даних групи № 3 встановлено, що корекція патологічного стану за допомогою гіпоглікемічних засобів має позитивний вплив, але не дозволяє виражено скоригувати патологічний розвиток гіпоксії. Результати 4-ї групи свідчать про те, що залучення донатора оксиду нітрогену та афліберцепта до корекції діабетичної ретинопатії коригує гіпоксичні зрушення та сприяє відновленню фізіологічного шляху синтезу оксиду нітрогену, максимально виражений ефект спостерігається на 180-у добу експерименту, але нормативних значень досягти не вдається.

Прослідковується, що корекція змодельованого патологічного стану шляхом зниження гіперглікемії, введення афліберцепта та бромфенаку (група № 5) дає позитивні результати, але менш виражені, аніж залучення до комплексної корекції розчину L-аргініну.

Виявлено, що у щурів у яких моделювали діабетичну ретинопатію з подальшою корекцією гіперглікемії, введенням афліберцепта, L-карнітину та бромфенаку (група № 6) наявна виражена тенденція до нормалізації досліджуваного маркера гіпоксії порівняно з попередніми розглянутими способами, але рівень 2,3 діфосфогліцерату еритроцитів не досягає нормативних значень.

Отримані дані дозволяють стверджувати, що спосіб корекції, обраний у 7-й групі (корекцію гіперглікемії, введення афліберцепта, розчину L-аргініну та цитиколіну), більш виражено нормалізує рівень 2,3 діфосфогліцерату еритроцитів порівняно з іншими групами нашого експерименту, його результативність виражено проявляється уже на 30-у добу, збільшуючись до 60-ї та 180-ї діб.

Отримані дані підтверджують виникнення та прогресування цукрового діабету у групі без корекції ($p < 0,001$). Доведено поетапне зниження гіперглікемії під впливом метформіну. Привертає увагу те, що у групах, в яких до корекції залучали донатор оксиду нітрогену – нормалізація рівня глюкози є більш вираженою та тривалою. Корекція гіпоглікемічними засобами у 3-й групі мала позитивний ефект, але не була спроможна повністю нормалізувати рівень глікемії, тому виникла необхідність у застосуванні додаткових засобів.

Застосування афліберцепту та донатора оксиду нітрогену у 4-й групі мала більш виражений позитивний ефект порівняно з групою № 3, проте результат не досягав контрольних показників. Доведено, що поєднане введення бромфенаку та афліберцепту у 5-й групі проявило себе менш результативно при дослідженні рівня глюкози крові на усіх етапах порівняно з даними 4-ї групи, в якій до корекції залучали донатор NO.

Доведено, що введення афліберцепту, L-карнітину та бромфенаку тваринам 6-ї групи мало більш виражений позитивний ефект у порівнянні з групою № 5, але не досягало значень 4-ї групи експерименту. Максимально ефективною корекцією виявилось поєднання метформіну, афліберцепту, L-аргініну та цитиколіну щурам 7-ї групи, про що свідчить нормалізація рівня досліджуваних показників на 30-у та 60-у добу експерименту, а на 180-у було зафіксовано максимально виражене

зниження гіперглікемії. Отримані дані підтверджують виникнення та прогресування цукрового діабету у групі без корекції ($p < 0,001$). Доведена поетапне зниження гіперглікемії під впливом метформіну.

Привертає увагу те, що у групах, в яких до корекції залучали донатор оксиду нітрогену, нормалізація рівня глюкози є більш вираженою та тривалою. Отримані результати свідчать про порушення функціонального стану ендотелію та фізіологічного синтезу оксиду нітрогену уже на 30-у добу розвитку експериментальної діабетичної ретинопатії з подальшим прогресуванням патологічних змін на 60-у та 180-у добу дослідження, про що свідчить зниження активності ендотеліальної синтази оксиду нітрогену (рис. 5) разом із підвищенням активності індуцибельної (рис. 6) у 2-й групі ($p < 0,001$), максимально виражене на 3-му етапі. Також привертає увагу значне збільшення рівня прозапального цитокіну ($p < 0,001$).



Рисунок 5 – Активність ендотеліальної синтази оксиду нітрогену у крові експериментальних тварин зі змодельованою діабетичною ретинопатією та при різних способах її корекції на 30-у, 60-у та 180-у добу. Бокс плоти ілюструють розподіл величин рівня досліджуваного показника в усіх групах експерименту на кожному із етапів дослідження ($n=20$)

При аналізі даних групи № 3 встановлено, що корекція патологічного стану за допомогою гіпоглікемічних засобів має позитивний вплив, але не дозволяє виражено скоригувати порушення функціонального стану ендотелію та відновити функціональний синтез оксиду нітрогену, що ще раз підтверджує необхідність залучення додаткових засобів корекції окрім нормалізації рівня глікемії.

Результати 4-ї групи свідчать про те, що залучення донатора оксиду нітрогену та афліберцепта до корекції діабетичної ретинопатії коригує ендотеліальну дисфункцію та сприяє відновленню фізіологічного шляху синтезу оксиду нітрогену, максимально виражений ефект спостерігається на 180-у добу експерименту, але нормативних значень досягти не вдається. Спостерігається позитивний вплив на зниження рівня інтерлейкіну 1β , але він не досягає наближення до норми.

Прослідковується, що корекція змодельованого патологічного стану шляхом зниження гіперглікемії, введення афліберцепта та бромфенаку (група № 5) дає позитивні результати, але менш виражені, аніж залучення до комплексної корекції розчину L-аргініну при дослідженні синтази NO, при аналізі рівня прозапального цитокіну результати є кращими. Також варто зауважити, що даний спосіб корекції не характеризується довготривалістю і на 180-у добу уже спостерігається виражене зниження його ефективності.

Виявлено, що у щурів у яких моделювали діабетичну ретинопатію з подальшою корекцією гіперглікемії, введенням афліберцепта, L-карнітину та бромфенаку (група № 6), наявна виражена результативність запропонованого способу корекції порівняно з попередніми розглянутими способами, активність eNOS підвищується уже на першому етапі і продовжує відновлюватися на наступних етапах експерименту, але не досягає нормативних значень (рис. 6).

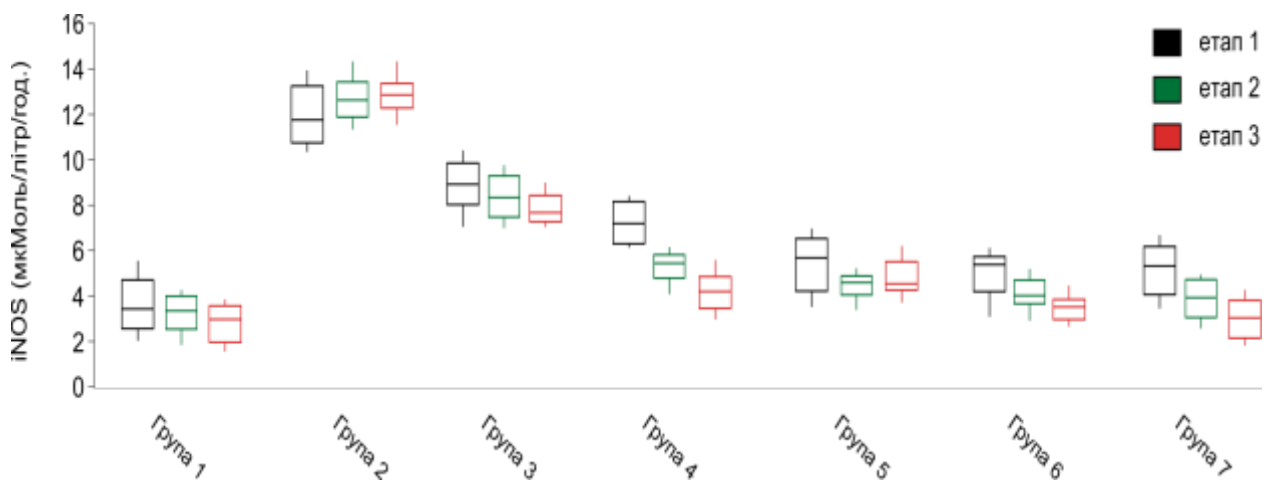


Рисунок 6 – Активність індукцибельної синтази оксиду нітрогену у крові експериментальних тварин зі змодельованою діабетичною ретинопатією та при різних способах її корекції на 30-у, 60-у та 180-у добу. Бокс плоти ілюструють розподіл величин рівня досліджуваного показника в усіх групах експерименту на кожному із етапів дослідження (n=20)

Також прослідковується позитивний вплив на активність індукцибельної NO-синтази та інтерлейкіну 1 β , між якими (як відомо) існує тісний взаємозв'язок. Отримані дані дозволяють стверджувати, що спосіб корекції, обраний у 7-й групі (корекцію гіперглікемії, введення афліберцепта, розчину L-аргініну та цитиколіну), є максимально ефективним із усіх, проаналізованих у дослідженні, його результативність виражено проявляється уже на 30-у добу, збільшуючись до 60-ї та 180-ї діб при аналізі усіх досліджуваних маркерів даного розділу.

Одержані результати свідчать про підвищення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів, починаючи із 30-ї та з подальшим прогресуванням на 60-у та 180-у доби експериментальної діабетичної ретинопатії, підтвердженням якого є збільшення рівня дієнових кон'югатів (рис. 7) та малонового діальдегіду (рис. 8) у 2-ї групі, максимум якого спостерігається на 3-му етапі. При цьому

спостерігається поетапне зниження активності пероксидази, яка є ферментом антиоксидантного захисту.

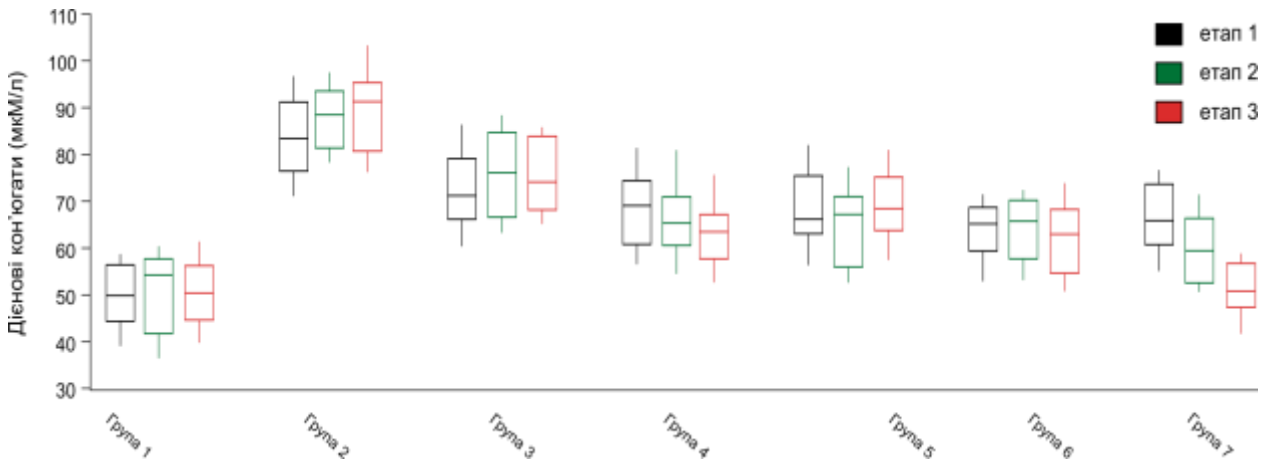


Рисунок 7 – Рівень дієнових кон'югатів у крові експериментальних тварин зі змодельованою діабетичною ретинопатією та при різних способах її корекції на 30-у, 60-у та 180-у добу. Бокс плоти ілюструють розподіл величин рівня досліджуваного показника в усіх групах експерименту на кожному із етапів дослідження (n=20)

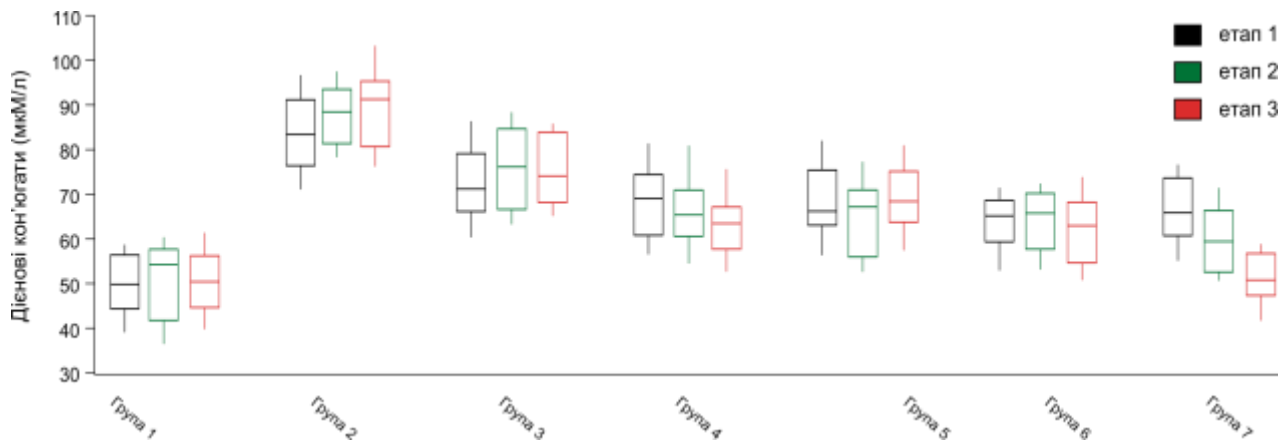


Рисунок 8 – Рівень малонового діальдегіду у крові експериментальних тварин зі змодельованою діабетичною ретинопатією та при різних способах її корекції на 30-у, 60-у та 180-у добу. Бокс плоти ілюструють розподіл величин рівня досліджуваного показника в усіх групах експерименту на кожному із етапів дослідження (n=20)

Корекція гіпоглікемічними засобами у 3-й групі мала позитивний ефект, але не була спроможна знизити рівень первинних і вторинних продуктів перекисного окислення ліпідів та відновити антиоксидантну активність, тому виникла необхідність у застосуванні додаткових засобів.

Застосування афліберцепту та донатора оксиду нітрогену у 4-й групі для корекції розвитку діабетичної ретинопатії суттєво пригнічувала окислювальний стрес, максимум якого припадав на 180-у добу експерименту, проте не досягав

контрольних показників. Доведено, що поєднане введення бромфенаку та афліберцепту у 5-й групі значно знижувало кількість первинних і вторинних продуктів ПОЛ, підвищувала активність пероксидази, але не так суттєво, як у 4-й групі.

Доведено, що введення афліберцепту, L-карнітину та бромфенаку тваринам 6-ї групи знижувало вміст дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду разом з підвищенням активності пероксидази вже на 30-у і було зниження продовжено на 60-у а 180-у добу дослідження, проте теж не досягало контрольних показників. Максимально ефективною корекцією виявилось поєднання метформіну, афліберцепту, L-аргініну та цитиколіну щурам 7-ї групи, про що свідчить нормалізація рівня досліджуваних показників на 30-у та 60-у добу експерименту, а на 180-у було зафіксовано зниження вмісту маркерів оксидативного стресу та нормалізація активності антиоксиданта до контрольних показників.

Результати гістологічного дослідження при експериментальній діабетичній ретинопатії та її корекції за допомогою метформіну, введенням афліберцепта, розчину L-аргініну та цитиколіну.

Дослідження гістологічних препаратів сітківки здорового щура показало наступне. По своїй організації сітківка представляє собою багат шарове утворення. Зовнішній шар (пігментний) утворений сплосченими клітинами зі сплосченими овальними ядрами, цитоплазма яких містить одиничні гранули меланіну різних розмірів. Над ними розміщений шар, що утворений стовпчастими структурами еозинофільного фарбування – палички і колбочки. Зверху цей шар прикритий тонкою щільною однорідною мембраною. Ближче внутрішньо розміщується достатньо широкий шар клітин з округлими різної хромності ядрами (рис. 9).

Ядра різного розміру, переважно – середнього. Цитоплазма клітин представлена тонким обідком навколо ядра. Вона забарвлена блідо еозинофільно. Зовнішній гранулярний, зовнішній край цього шару слабо виражений. Цей шар відокремлений від більш внутрішніх утворень шаром, який утворений неупорядковано розташованими короткими тонкими волокнами. Над ним розташований шар з округлими клітинами, які мають середні, блідно зафарбовані ядра та тонкий обідок цитоплазми. Ці клітини по зовнішньому вигляду аналогічні попередньо описаному зовнішньому гранулярному шару, проте візуально він меншої ширини. Над ним розташований шар, що утворений тонкими ніжними, короткими, блідо-еозинофільними волокнами. Ближче до порожнини ока знаходяться в один ряд гангліонарні клітини, для яких характерна наявність середніх розмірів ядер з різним ступенем інтенсивності фарбування та достатньо великою за обсягом дуже блідно пофарбованою цитоплазмою. Над ним визначається тонкий шар неупорядкованих тонких волокон, частина з яких формує аркоподібні утворення. Зверху сітківка прикрита тонкою однорідною посилено еозинофільною мембраною.

Гістологічне дослідження сітківки ока щура із змодельованим цукровим діабетом показало наступне. Пошарова організація сітківки у піддослідних тварин зберігається.

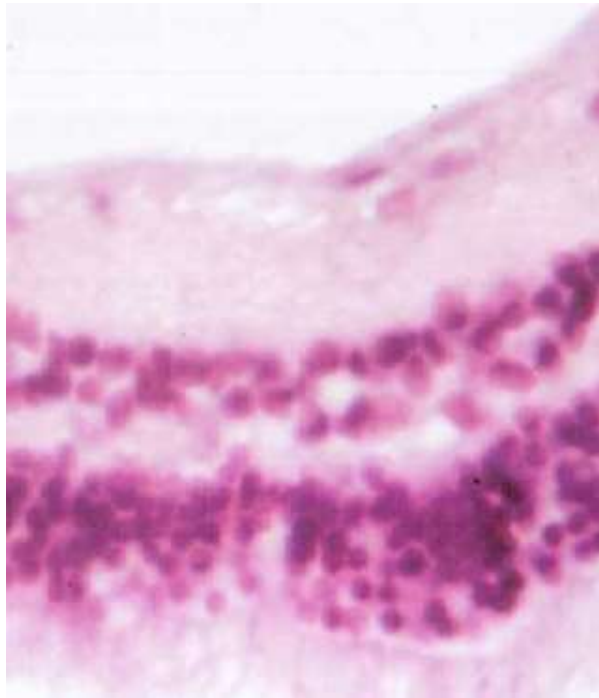


Рисунок 9 – Сітківка здорового щура. Зовнішній гранулярний шар зхвилеподібним зовнішнім краєм. Тонкий внутрішній гранулярний шар з клітинами із досить великими ядрами. Гангліонарний шар містить нейрони з різною хромністю ядер. Фарб. Гематоксилін-еозин. Зб.: x 300

Зовнішній пігментний шар представлений одним рядом клітин, в основному із плоскими ядрами, в яких відсутні пігменти гранули. Щільність розміщення клітин візуально дещо менша, ніж у контролі. Також спостерігається присутність одиничних клітин з округлими ядрами, чие фарбування світліше, ніж у плоских. Зовнішня гліальна мембрана тонка, блідо еозинофільна. Шар паличок та ковбочок представлений щільними, розташованими стовпчиками структурами. Особливістю цього шару в експериментальних тварин була неоднакова інтенсивність їх фарбування, поруч з помірковано-еозинофільними утвореннями. Були присутні бліді стовпчасті структури, а також мали місце невеликі «прогалини» в цьому шарі.

Зовнішній гранулярний шар візуально тієї ж ширини, як і у контрольних тварин. Клітини, що розташовуються в ньому, мають округлі, поміркованої хромності ядра. Особливість в експериментальних щурів полягає в тому, що замість легкої хвилястості зовнішнього краю цього шару у інтактних щурів, в них він формує доволі значні виступи, в яких клітини розріджені, цілком вірогідно, що через набряк.

Зовнішній сітчастий шар формується короткими тонкими волокнами, блідо еозинофільними. На відміну від контролю, розташування волокон набрякле і розріджене. кількість волокон візуально знижено.

Внутрішній гранулярний шар потоншений та представлений клітинами з округлими ядрами та різним ступенем хромності. Особливістю цього шару у піддослідних тварин було виражене розрідження їх розподілу та одноманітно невеликі розміри ядер. Це може бути пов'язано із зменшенням кількості

клітинних елементів або набряком тканин. Внутрішній сітчастий шар сітківки за шириною відповідає даним контрольних тварин. В тій частині цього шару, який прилягає до гангліонарного, спостерігається наявність набрякливо-розріджених ділянок. Волокна, які формують цей шар тонкі, блідо-еозинофільні, короткі.

Шар гангліонарних клітин відрізняється нерівномірним розподілом клітин. Ділянки з рівномірно розподіленими нейронами межують із ділянками, де такі клітини поодинокі. Слід підкреслити вакуолізацію значної частини гангліонарних клітин. При тому в ділянках із більш щільним розміщенням клітин вакуолі в їх цитоплазмі дрібні, а ядра достатньо великі, поміркованої хромності. В ділянках, де гангліонарні клітини розріджені в їх цитоплазмі вакуолі великі, а ядра дрібні, темно пофарбовані (рис. 10).

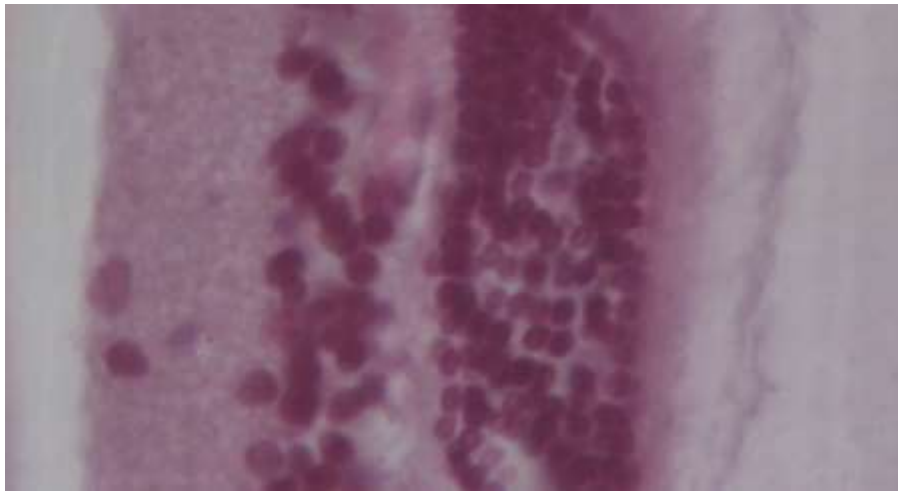


Рисунок 10 – Сітківка щура зі змодельованим цукровим діабетом. 60-а доба дослідження. Розрідження внутрішнього гранулярного шару. Розрідження клітин в гангліонарному шарі, їх різна хромність. Фарб.: Гематоксилін-еозин. Зб: x 300

У шарі нервових волокон аочна організація їх розподілу змазана, а самі волокна набрякливо-набухлі. Зовнішня гліальна мембрана з ділянками набухання-розрихлення, блідо-забарвлена. Особливістю структури ока цих тварин була наявність в кришталіці окремих темних гранул ближче до його зовнішньої поверхні (рис. 11).

Морфологічне дослідження сітківки щурів з моделлю цукрового діабету, які отримували комплексну корекцію виявило ряд позитивних змін у порівнянні з даними тварин, у яких моделювали патологічний процес без подальшої корекції. Стан зовнішнього пігментного шару практично мало відрізняється від контрольної групи. В основному він складається із клітин зі сплюсненими ядрами, з округлими світлими ядрами наявні окремі клітини.

Гранули пігменту окремі, дрібні, зустрічаються рідко. Особливістю цієї групи була наявність помірно повнокровних судин, які прилягали до пігментного шару. Візуально їх дещо більше ніж у тварин із некоригованим цукровим діабетом.

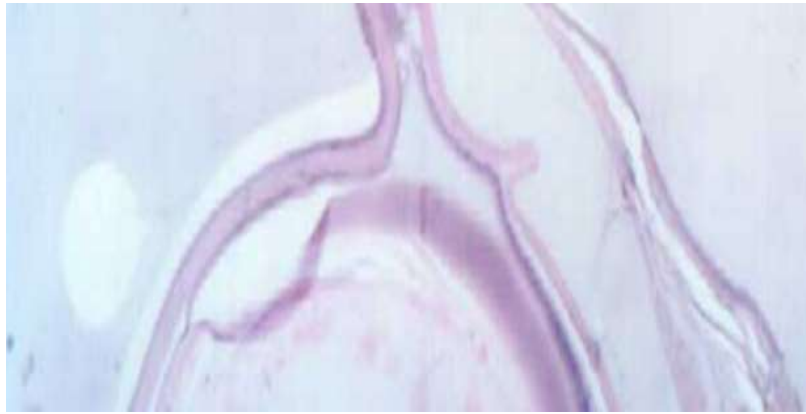


Рисунок 11 – Наявність включень у кришталик щура з експериментальним цукровим діабетом. Фарб.: Гематоксилін-еозин. Зб.: x50

Зовнішня гліальна мембрана тонка, однорідна, блідо еозинофільна. Шар паличок та колбочок представлений стовпчастими структурами монотонно поміркованого еозинофільного фарбування. У тварин з некоригованим цукровим діабетом спостерігались прогалини даного шару, поодинокі візуально вони менші за розмірами ніж у тварин, у попередній групі.

Зовнішній гранулярний шар характеризується шириною, яка близька до контрольних показників. Його особливість полягає в тому, що ці клітини формують або щільні скупчення, або ділянки з поміркованою щільністю розподілу. Клітини цього шару мають округлі ядра, соковито пофарбовані, в основному середніх розмірів. Ще однією особливістю цього шару є слабка вираженість хвилястості зовнішнього шару. Шар фіброзних волокон відрізняється тим, що ділянки, де розміщені одні волокна, межують з ділянками, куди проникають клітини із гранулярних шарів (рис. 12).

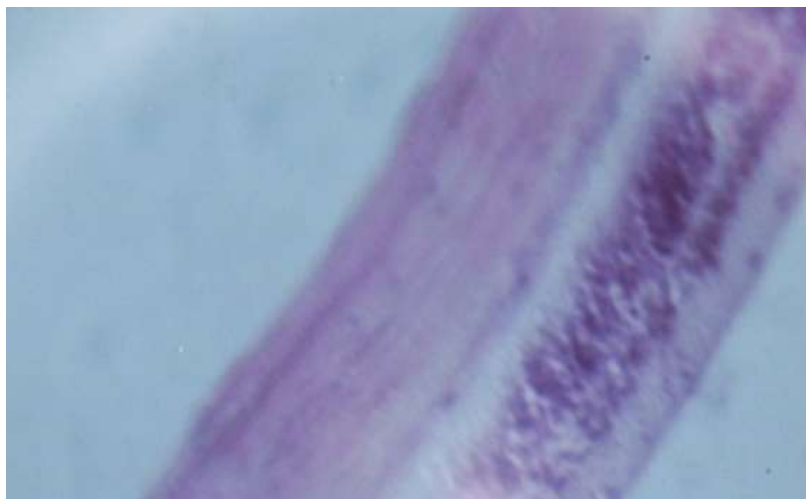


Рисунок 12 – Сітківка щура на 60-у добу моделювання цукрового діабету на тлі комплексної корекції. зовнішній гранулярний шар з різної щільності розподілення клітин. Проникнення клітин в сітчастий шар.
Фарб.: Гематоксилін-еозин. Зб.: x10

Внутрішній гранулярний шар тонкий, розподілення клітин достатньо рівномірне. Набрякле розрідження не виражене. Тільки поодинокі клітини проникають в сусідні шари. Внутрішній шар волокон (шар нервових волокон) достатньо однорідний. Волокна блідо пофарбовані. Особливістю цього шару у щурів, які отримували комплексну корекцію, є відсутність вираженого набряку чи вакуолізації структур цього шару. Слід підкреслити, що це більш виражено в частині цього шару, яка наближена до гранулярного. Що стосується гангліонарного шару, то візуально щільність розподілення в ньому клітин вища у тварин з коригованим патологічним станом. Проте пов'язано це із появою між нейронами клітин з соковито зафарбованими ядрами, які відокремились від внутрішнього гранулярного шару. Гангліонарні клітини характеризуються набряком тіла та його нечіткими кордонами, з доволі блідо пофарбованими ядрами. Вакуолізація клітин не спостерігається (рис. 13).

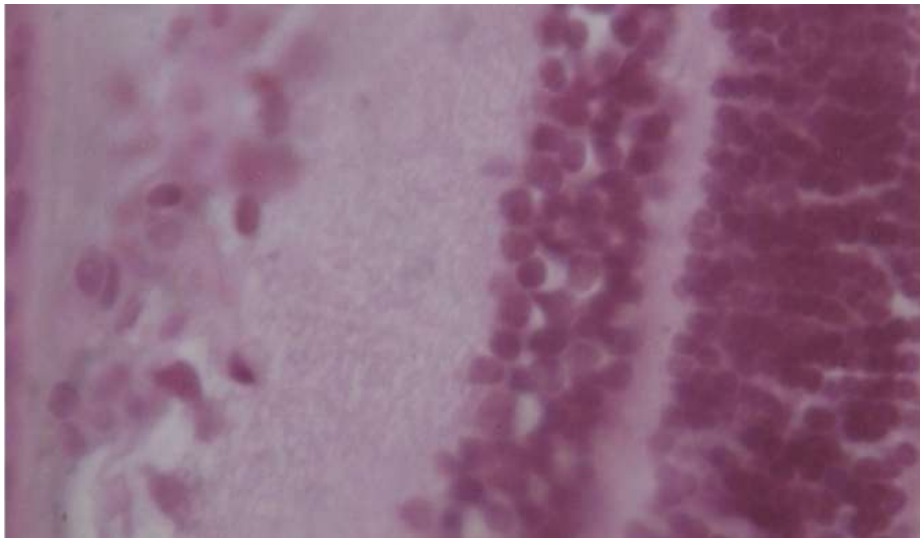


Рисунок 13 – Сітківка щура на 60-у добу моделювання цукрового діабету.

Розрідження внутрішнього гранулярного шару. Розрідження клітин в гангліонарному шарі, їх різна хромність. Фарб.: Гематоксилін-еозин. Зб.: x300

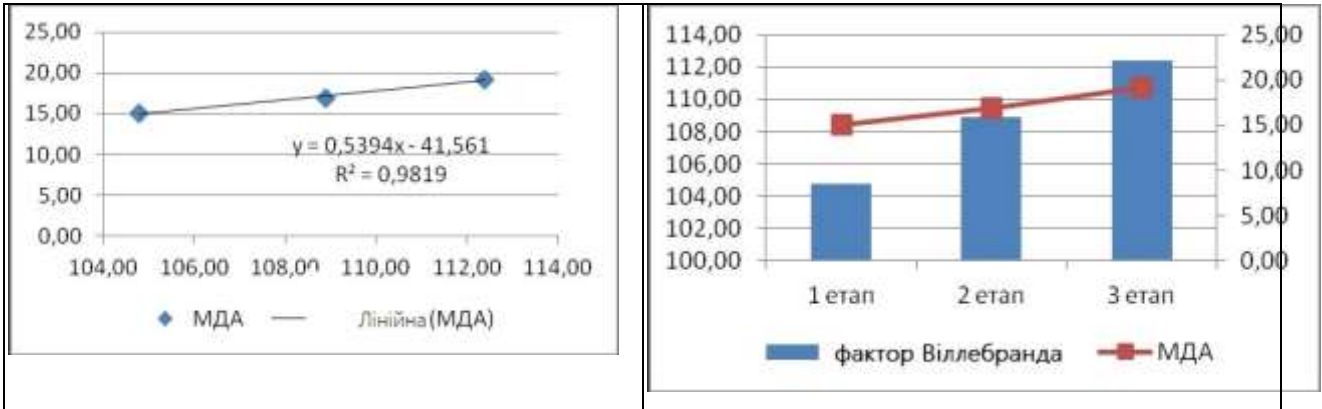
Для шару нервових волокон характерне їх набрякання та неупорядкований розподіл. В кришталику темні, точкові включення зберігаються.

Таким чином, результати проведених досліджень довели, що розвиток моделі цукрового діабету щурів супроводжується порушенням у сітківці ока у вигляді набрякових зрушень волокон та набряком формуючих її клітин, нерівномірністю розподілу клітин гангліонарного шару і вакуолізації цитоплазми деяких із них. Застосування комплексу коригуючих препаратів порушення метаболізму і ангіопатій, які характерні для цукрового діабету впливає на стан сітківки. Суттєво зменшуються набрякові зміни її структурних елементів. Візуально збільшується кількість судин на межі із сітківкою. Більш соковитим стає фарбування клітин гангліонарного шару.

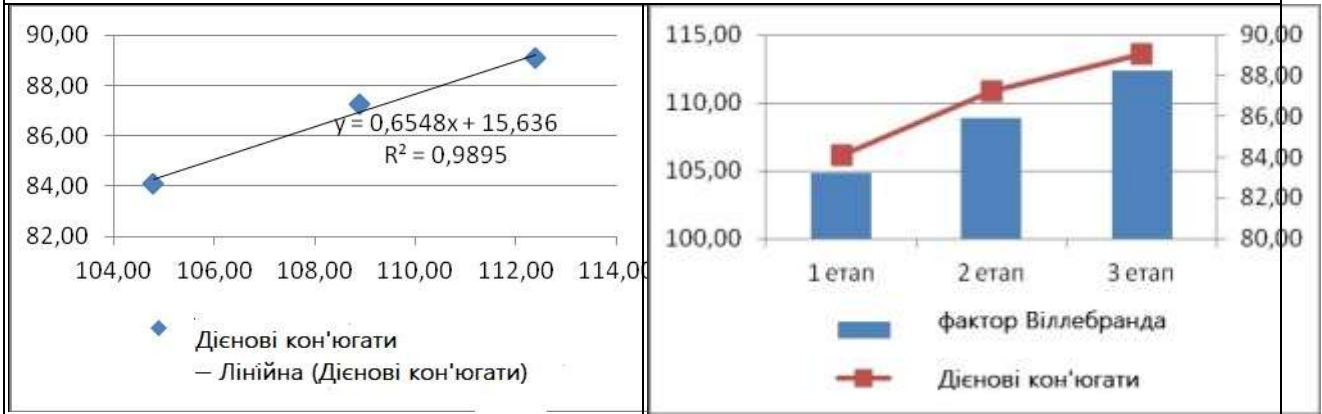
Результати побудови кореляційних полів з лініями тренду

Проаналізовано залежність між середніми значеннями показників фактору Віллебранда, ендотеліну-1 та МДА, дієнових кон'югатів, пероксидази у групі 2

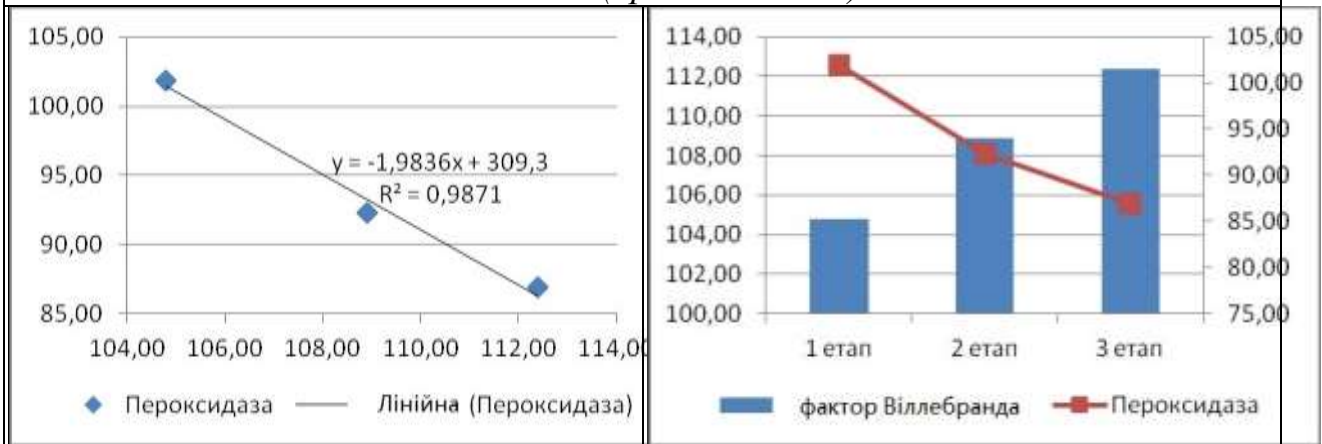
(рис. 14). Варто зауважити, що кількість етапів рівна 3, тому розрахунок коефіцієнту кореляції та його інтерпретація не є коректними. А ось аналіз кореляційних полів та аналіз показників на основі графіків є доцільним.



а) залежність між показниками фактора Віллебранда та МДА (прямий зв'язок)



б) залежність між показниками фактора Віллебранда та дієнових кон'югатів (прямий зв'язок)



в) залежність між показниками фактора Віллебранда та пероксидази (обернений зв'язок)

Рисунок 14 – Графіки залежності між середніми значеннями показнику фактора Віллебранда, МДА, дієнових кон'югатів, пероксидази

Для візуалізації залежності між кожною парою показників було побудовано два графіки:

1. *Кореляційне поле з лінійним трендом та коефіцієнтом детермінації.* Кожне кореляційне поле має три точки (по кількості етапів) з координатами точок (x_i, y_i) , де x_i означитиме значення 1-го показника на i -му етапі, y_i - значення 2-го показника на i -му етапі. Кореляційне поле, лінійний тренд та коефіцієнт детермінації отримали за допомогою відповідних функцій в MS Excel;
2. *Графік із значенням обох показників*, на якому використано дві осі (ліву та праву), оскільки кожна пара показників має різні одиниці виміру.

З рис. 14 видно, що між показником фактор Віллебранда та показником МДА прослідковується прямий лінійний зв'язок, тому що точки кореляційного поля практично розміщені на прямій ($R^2 = 0,982$). Аналогічний тип прямого лінійного зв'язку прослідковується між фактором Віллебранда та дієновими кон'югатами ($R^2 = 0,99$). Зазначені результати підтверджують взаємообтяжуючий зв'язок розвитку ендотеліальної дисфункції та окислювального стресу.

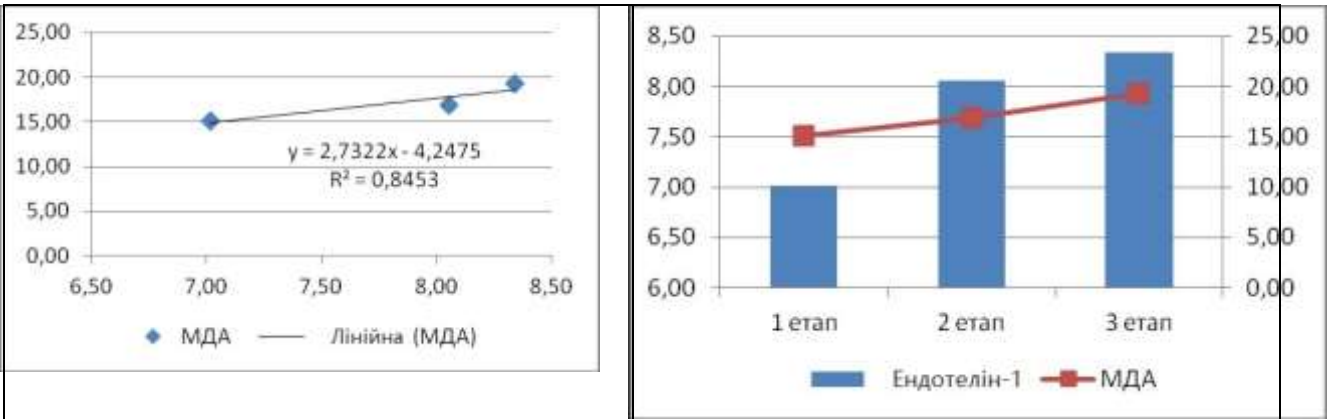
А ось між фактором Віллебранда та пероксидазою прослідковується обернений лінійний зв'язок ($R^2 = 0,987$). Із збільшенням показників фактору Віллебранда за етапами відмічено зменшення показників пероксидази, що свідчить про взаємозв'язок дисфункції ендотелію та ослаблення антиоксидантного захисту.

Аналогічно проаналізовано залежність між середніми значеннями показників ендотеліну-1 та малонового діальдегіду, дієнових кон'югатів, пероксидази у групі 2.

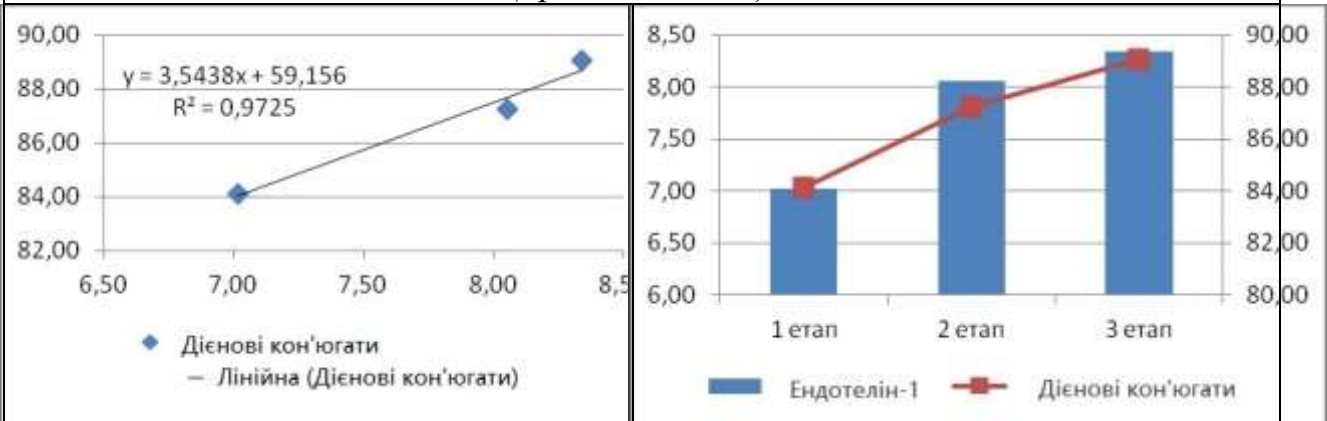
З рис. 15 видно, що тут ситуація аналогічна попередній. Перші два показники – малоновий діальдегід, дієнові кон'югати мають практично прямий ліній зв'язок із показниками ендотеліну-1 (а) $R^2 = 0,845$; б) $R^2 = 0,973$). Дані результати підтверджують взаємозв'язок порушення функціонального і структурного стану ендотелію із розвитком окислювального стресу. А показник пероксидази має обернений лінійний зв'язок з показниками ендотеліну-1 ($R^2 = 0,976$), що, як і у випадку з фактором Віллебранда, свідчить про порушення антиоксидантного захисту при дисфункції ендотелію.

Проведено аналіз залежності показників 2,3 дифосфоглицерату, фактору Віллебранда та eNOS (рис. 16). З рис. 16 видно, що у перших двох парах показників а) та б) прослідковується обернений лінійний зв'язок між показниками. Із збільшенням показників eNOS за етапами, показники 2,3 дифосфоглицерату та фактору Віллебранда зменшуються.

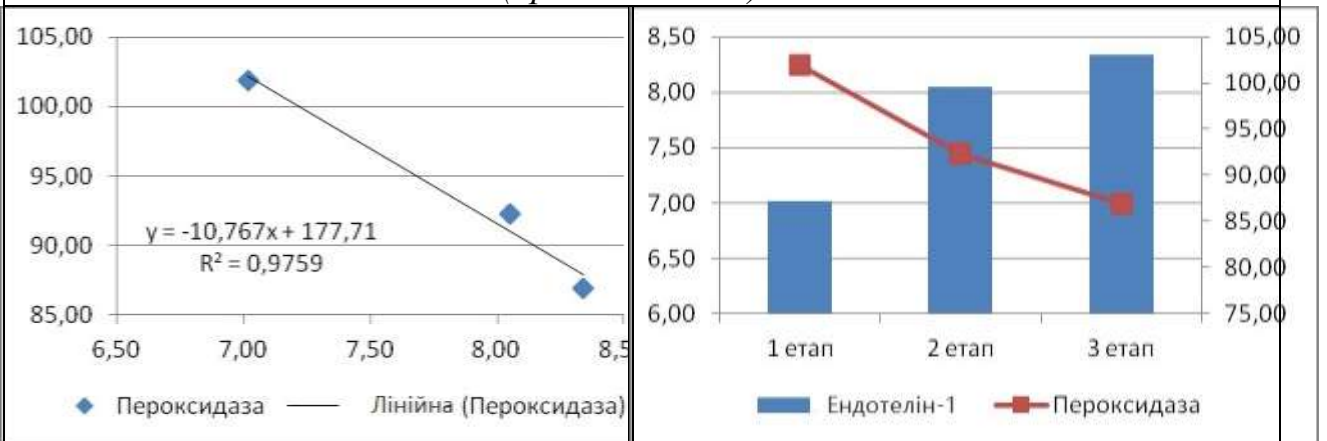
У випадку оберненої залежності між показниками фактору Віллебранда та eNOS прослідковується практично функціональний зв'язок, оскільки коефіцієнт детермінації рівний майже 1 ($R^2 = 0,996$). Одержані результати свідчать про те, що порушення структурного і функціонального стану ендотелію та розвиток гіпоксії взаємопов'язаний з порушенням фізіологічного шляху синтезу оксиду азоту.



а) залежність між показниками ендотеліну-1 та МДА (прямий зв'язок)

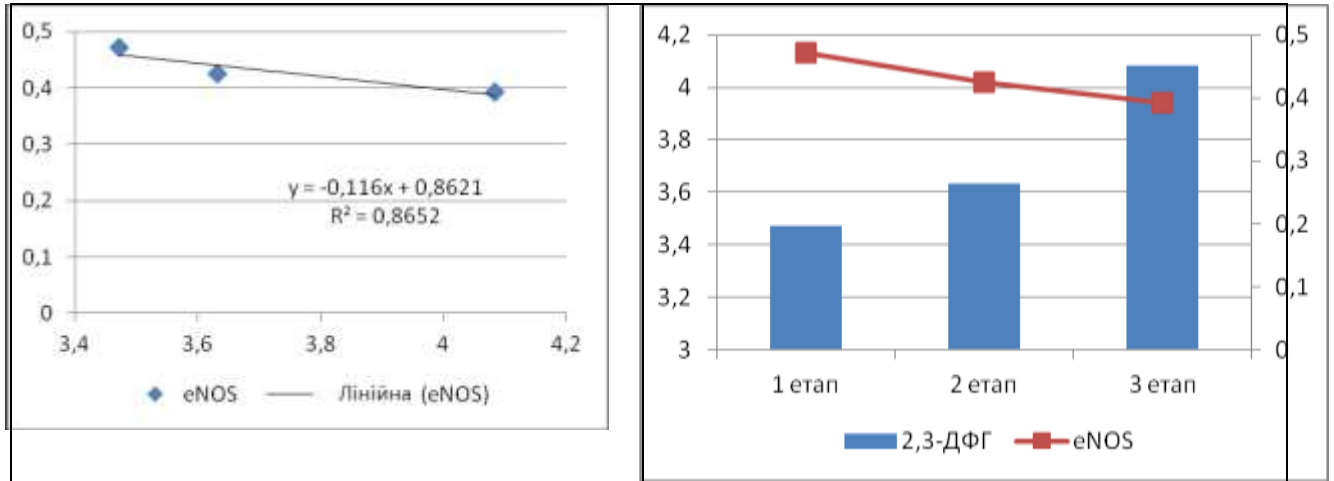


б) залежність між показниками ендотеліну-1 та дієнових кон'югатів (прямий зв'язок)

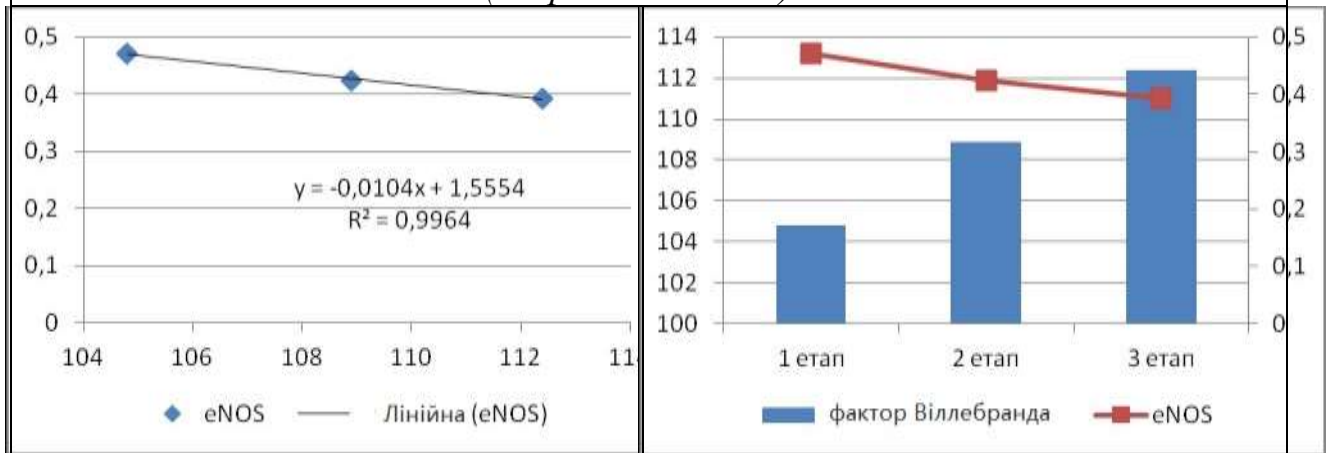


в) залежність між показниками ендотеліну-1 та пероксидази (обернений зв'язок)

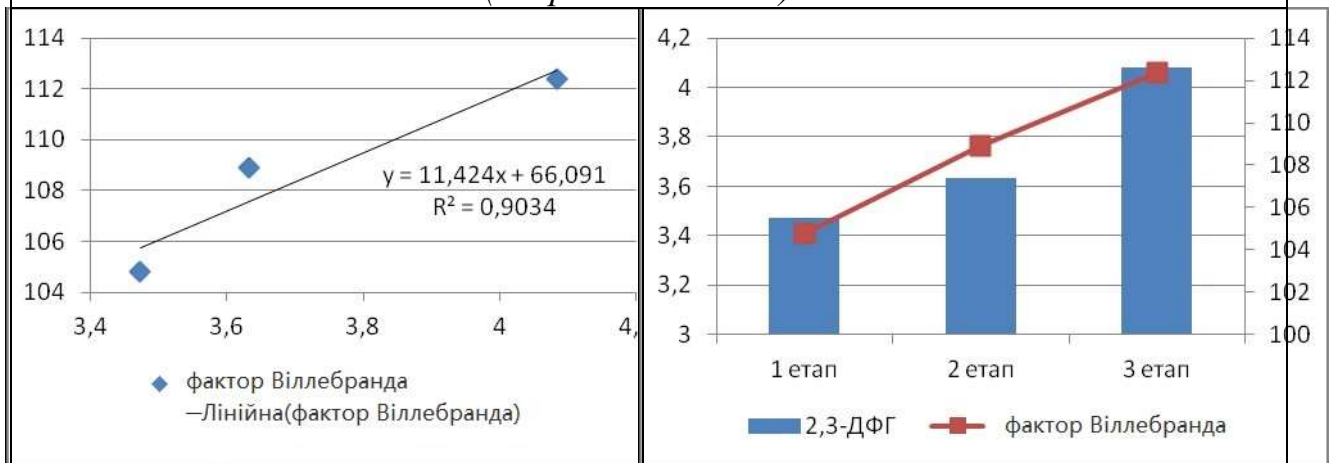
Рисунок 15 – Графіки залежності між середніми значеннями показнику ендотеліну-1 та середніми значеннями показників МДА, дієнових кон'югатів, пероксидази



а) залежність між показниками 2,3 діфосфогліцерату та eNOS (обернений зв'язок)



б) залежність між показниками фактора Віллебранда та eNOS (обернений зв'язок)



в) залежність між показниками 2,3 діфосфогліцерату та фактора Віллебранда (прямий зв'язок)

Рисунок 16 – Графіки залежності між середніми значеннями показнику 2,3 дифосфогліцерату, фактору Віллебранда та eNOS

А ось залежність між показниками 2,3 діфосфогліцерату та фактору Віллебранда має прямий зв'язок між змінними ($R^2 = 0,903$), що ще раз підтверджує обтяжуючий взаємовплив між гіпоксією та ендотеліальною дисфункцією. Всі тренди, зображені на рисунках, дуже добре узгоджені з емпіричними даними, оскільки характеризуються високими коефіцієнтами детермінації.

Отримані результати свідчать про те, що фактор Віллебранда, ендотелін-1, 2,3-діфосфогліцерат, МДА, дієнові кон'югати та eNOS є інформативними маркерами у патогенезі експериментальної діабетичної ретинопатії.

У результаті проведених досліджень встановлено, що між показником фактору Віллебранда та малоновим діальдегідом прослідковується прямий лінійний зв'язок, оскільки точки кореляційного поля практично розміщені на прямій. Аналогічний тип прямого лінійного зв'язку прослідковується між фактором Віллебранда та дієновими кон'югатами. Зазначені результати підтверджують взаємообтяжуючий зв'язок розвитку ендотеліальної дисфункції та окислювального стресу.

Між фактором Віллебранда та пероксидазою прослідковується обернений лінійний зв'язок. Із збільшенням показників фактору Віллебранда за етапами відмічено зменшення показників пероксидази, що свідчить про взаємозв'язок дисфункції ендотелію та ослаблення антиоксидантного захисту.

У результаті дослідження встановлено, що перші два показники: малоновий діальдегід та дієнові кон'югати мають практично прямий ліній зв'язок з показниками ендотеліну-1. Дані результати підтверджують взаємозв'язок порушення функціонального і структурного стану ендотелію із розвитком окислювального стресу. Встановлено, що показник пероксидазу має обернений лінійний зв'язок з показниками ендотеліну-1, що, як і у випадку з фактором Віллебранда, свідчить про порушення антиоксидантного захисту при дисфункції ендотелію. У результаті проведеного аналізу залежності показників 2,3 діфосфогліцерату, фактору Віллебранда та eNOS виявлено, що у перших двох парах показників прослідковується обернений лінійний зв'язок між показниками. Із збільшенням показників eNOS за етапами, показники 2,3 діфосфогліцерату та фактору Віллебранда зменшуються. У випадку оберненої залежності між показниками фактору Віллебранда та eNOS прослідковується практично функціональний зв'язок, оскільки коефіцієнт детермінації рівний майже 1. Одержані результати свідчать про те, що порушення структурного і функціонального стану ендотелію та розвиток гіпоксії взаємопов'язані з порушенням фізіологічного шляху синтезу оксиду азоту. Виявлено залежність між показниками 2,3 діфосфогліцерату та фактору Віллебранда, яка має прямий зв'язок між змінними, що ще раз підтверджує обтяжуючий взаємовплив між гіпоксією та ендотеліальною дисфункцією.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі проведено узагальнення і запропоновано нове вирішення актуальної наукової проблеми патогенезу ускладнень експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету, зокрема діабетичної ретинопатії і дисфункції ендотелію судин та їх корекції.

1. На тлі моделювання стрептозотоцинового цукрового діабету у щурів розвивалася діабетична ретинопатія та ендотеліальна дисфункція судин, про що свідчить наявність набрякових зрушень волокон та набряк формуючих клітин сітківки, нерівномірністю розподілу клітин гангліонарного шару і вакуолізації цитоплазми деяких із них та підвищення біохімічних маркерів порушення структури та функціонування ендотеліоцитів.

2. Встановлено, що у патогенезі діабетичної ретинопатії важливу роль відіграє порушення ендотелію судин, про що свідчить збільшення рівнів фактора Віллебранда (на 19,7 % на 30-у добу, на 22,7 % на 60- у і на 25,1 % на 180-у добу), ендотеліну-1 (на 56,8 % на I-у етапі, на 62,4 % на II-у і на 63,7 % на III-у етапі) та асиметричного диметиларгініну (на 65,6 % на I-у етапі, на 71,9 % на II-у і на 75,8 % на III-у етапі), порівняно з даними інтактних тварин) ($p < 0,001$).

3. Виявлено дисбаланс вазоконстрикторно-вазодилататорного потенціалу у бік констрикторної компоненти та пригнічення фізіологічного розслаблення тону судин при експериментальній діабетичній ретинопатії, про що свідчить збільшення рівня ендотеліну-1 на кожному із етапів дослідження ($p < 0,001$) та зменшення вмісту S-нітрозотіолів (на 110,4 % на 30-у добу, на 139,9 % на 60-у та на 190,7 % на 180-у добу, у порівнянні з інтактною групою).

4. Встановлено перехід синтезу оксиду нітрогену на альтернативний шлях, про що свідчить посилення активності індукцибельної NO-синтази при експериментальній діабетичній ретинопатії у щурів із змодельованим стрептозотоциновим діабетом (на 69,7 % на I-у етапі, на 74,7 % на II- у, і на 77,6 % на III-у етапі у порівнянні з інтактною групою, $p < 0,001$) та зменшення активності ендотеліальної синтази оксиду азоту (на 58,1 % на I-у етапі, на 76,4 % на II-у етапі, та на 87,5 % на III-у етапі дослідження).

5. Доведено збільшення рівня 2,3 дифосфогліцерату еритроцитів (на 65 % на 30-у добу; на 66,4 % на 60-у та на 70,2 % на 180-у добу у групі зі змодельованою патологією, порівняно з інтактною групою, $p < 0,001$) у крові щурів, що підтверджує значну роль гіпоксії у розвитку експериментальної діабетичної ретинопатії.

6. Встановлено дисбаланс між про- та антиоксидантною системою у патогенезі експериментальної стрептозотоцинової діабетичної ретинопатії, що підтверджується підвищенням рівня первинних та вторинних продуктів перекисного окислення ліпідів та зниженням антиоксидантного захисту, про що свідчить підвищення рівня дієнових кон'югатів на 40,3 % на I-у етапі, на 42,5 % на II-у етапі, на 43,7 % на III етапі, збільшення рівня малонового діальдегіду на 66,5 %, 70 % та 73,7 % відповідно на кожному із етапів, та зниження активності пероксидази на 49,3 % на 30-у добу, 64,8 % на 60-у добу, та на 75 % на 180-у добу дослідження у порівнянні з інтактною групою ($p < 0,001$).

7. Доведена вагома роль фактору росту судин для визначення ступеню тяжкості стрептозотоцинової діабетичної ретинопатії на різних етапах (спостерігається його підвищення на 67,8 % на I-у, на 121 % на II-у та на 144,9 % на III етапі порівняно з інтактною групою, $p < 0,001$).

8. Доведено діагностичну значущість значущість 2,3 дифосфогліцерату еритроцитів, фактора Віллебранда та ендотеліну-1 для прогнозу перебігу досліджуваної патології.

9. Встановлена роль запалення у патогенезі діабетичної ретинопатії, судячи по збільшенню рівня інтерлейкіну 1 В ($p < 0,001$) порівняно з даними інтактної групи (на 49,6 % на 30-у добу експерименту, на 56,7 % на 60-у та на 62,6 % на 180-у добу).

10. Розроблено патогенетично обгрунтовані схеми корекції експериментальної стрептозотицинової діабетичної ретинопатії, найбільш ефективним із них виявився комплекс із гіпоглікемічною дією (метформін), донатором оксиду нітрогену та антиоксиданом (L-аргінін), мембранстабілізуючим засобом (цитиколін), та інгібітором неоангіогенезу (афліберцепт), про що свідчить найбільш виражена нормалізація досліджуваних показників у 7-й групі, порівняно з іншими групами експерименту, в яких коригували патологічний процес ($p < 0,001$).

11. Апробована розробка математичної моделі для прогнозу та оцінки ступеня тяжкості перебігу діабетичної ретинопатії. Отримане рівняння

$$G(z) = \frac{e^{(-642,032+44,993 \cdot x_1+35,443 \cdot x_2+2,987 \cdot x_3)}}{1+e^{(-642,032+44,993 \cdot x_1+35,443 \cdot x_2+2,987 \cdot x_3)}}$$

логістичної регресії має такий вигляд

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Sirman Ya. V., Savytskyi I. V. Analysis of peroxidase activity in diabetic retinopathy and in applying various corrective means. *Journal of Education, Health and Sport*. 2019. Vol. 9, № 11. P. 442–454. (Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку. Співавтор проф. Савицький І. В. надавав консультативну допомогу).

2. Sirman Ya. V., Savytskyi I. V. Study of endothelial dysfunction and asymmetric dimethylarginine levels. *Journal of Education, Health and Sport*. 2019. Vol. 9, № 10. P. 395–412. (Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку. Співавтор проф. Савицький І. В. надавав консультативну допомогу).

3. Sirman Ya. V., Savytskyi I. V. Study of vasodilation processes. *Journal of Education, Health and Sport*. 2019. Vol. 9, № 12. P. 325–337. (Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку. Співавтор проф. Савицький І. В. надавав консультативну допомогу).

4. Сірман Я. В., Савицький І. В. Патогенез ендотеліальної дисфункції при діабетичній ретинопатії експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету. *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної*

стоматологічної академії. 2019. Т. 19, вип. 3 (67). С. 161–165. (Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку. Співавтор проф. Савицький І. В. надавав консультативну допомогу).

5. Сірман Я. В., Савицький І. В., Прейс Н. І. Динаміка рівню малонового діальдегіду при експериментальній діабетичній ретинопатії та способах її корекції. *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії*. 2020. Т. 20 № 4. С. 95–100. (Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку. Співавтор проф. Савицький І. В. надавав консультативну допомогу, співавтор Прейс Н.І. приймала участь у проведенні досліджень).

6. Сірман Я. В., Савицький І. В. Динаміка активності ендотеліальної синтази оксиду азоту при експериментальній діабетичній ретинопатії. *Офтальмологічний журнал*. 2020. № 6. С. 44–54. (SCOPUS) (Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку. Співавтор проф. Савицький І. В. надавав консультативну допомогу).

7. Sirman Ya. V., Savytskyi I. V. Analysis of the relationship between the activity of inducible nitric oxide synthase and interleukin-1 in the pathogenesis of experimental diabetic retinopathy. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020. Vol. 10, № 1. P. 320–329. (Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку. Співавтор проф. Савицький І. В. надавав консультативну допомогу).

8. Von Willebrand factor level dynamic during the endothelial dysfunction development in experimental diabetic retinopathy / Ya. V. Sirman, I. V. Savytskyi, A. I. Gozhenko, N. S. Badiuk, N. I. Preys, O. F. Dzygal. *PharmacologyOnLine*. 2020. Vol. 3. P. 247–260. (SCOPUS) (Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку. Співавтори проф. Савицький І. В. та проф. Гоженко А. І. надавали консультативну допомогу; співавтори Бадюк Н. С. і Прейс Н.І. приймали участь у проведенні досліджень).

9. Sirman Ya. V., Savytskyi I. V. Analysis interconnection level index marker by endothelial NOS, hypoxia and dysfunction in the pathogenesis of experimental diabetic retinopathy. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020. Vol. 10, № 3. P. 302–311. (Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку. Співавтор проф. Савицький І. В. надавав консультативну допомогу).

10. Sirman Ya.V., Preys N. I., Savytskyi I. V. Study of reduction of antioxidant protection in the pathogenesis of experimental diabetic retinopathy. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020. Vol. 10, № 11. P. 306–311. (Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до

друку. Співавтор проф. Савицький І. В. надавав консультативну допомогу, співавтор Прейс Н.І. приймала участь у проведенні досліджень).

11. Sirman Ya. V., Savytskyi I. V., Preys N. I. Changes in the asymmetric dimethylarginine and endothelial nitric oxide synthase levels in pathogenesis of investigational diabetic retinopathy. *Вісник морфології*. 2020. Т. 26, № 3. Р. 69–74. (Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку. Співавтор проф. Савицький І. В. надавав консультативну допомогу, співавтор Прейс Н. І. приймала участь у проведенні досліджень).

12. Savitsky I. V., Gritsan I. I., Sarakhan V. M., Sirman Ya. V., Preys N. I. Features of the system of antioxidant protection and lipid peroxidation in microangiopathies against type 2 diabetes mellitus. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020. Vol. 10, № 10. Р. 410-417. (Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку. Співавтор проф. Савицький І. В. надавав консультативну допомогу, співавтори Грицан І. І., Прейс Н.І., Сарахан В. М. приймали участь у проведенні досліджень).

13. Results of histological examination of experimental diabetic retinopathy and its correction with metformin, aflibercept, L-arginine solution and cyticolin / Y. V. Sirman, I. V. Savytskyi, N. I. Preys, O. M. Blavatska. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020. Vol. 10, № 12. Р. 426–435. (Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку. Співавтор проф. Савицький І. В. надавав консультативну допомогу, співавтори Прейс Н. І., Блавацька О. М. приймали участь у проведенні досліджень).

14. Показники коагуляційного гемостазу та системи фібринолізу при цукровому діабеті 2 типу із різною вираженістю ангіопатій / І. І. Грицан, Н. І. Прейс, Я. В. Сірман, І. В. Савицький, В. М. Сарахан. *Вісник морської медицини*. 2020. № 4 (89). С. 23–29. (Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку. Співавтор проф. Савицький І. В. надавав консультативну допомогу, співавтори Грицан І. І., Прейс Н.І., Сарахан В. М. приймали участь у проведенні досліджень).

15. Sirman Ya. V., Savytskyi I. V., Preys N. I. Prediction model for severity of diabetic retinopathy derived from review of endothelial dysfunction and hypoxia markers. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2021. № 1 (17). С. 76–80. (Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку. Співавтор проф. Савицький І. В. надавав консультативну допомогу, співавтор Прейс Н. І. приймала участь у проведенні досліджень).

16. Sirman Y. V., Savytskyi I. V. The role of lipid peroxidation in the pathogenesis of experimental diabetic retinopathy. *Journal of Education, Health and Sport*. 2021. Vol. 11, № 2. Р. 347–356. (Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати,

сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку. Співавтор проф. Савицький І. В. надавав консультативну допомогу).

17. Dynamics of vasoconstrictor-vasodilation potential on the background of the development of experimental diabetic retinopathy / Ya. V. Sirman, N. I. Preys, I. V. Savitsky, N. S. Badiuk, O. M. Blavatska, I. I. Hrytsan, S. V. Tsyroviaz. *PharmacologyOnLine*. 2021. Vol. 1. P. 90–95. (SCOPUS) (Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку. Співавтор проф. Савицький І. В. надавав консультативну допомогу, співавтори Прейс Н. І., Бадюк Н. С., Блавацька О. М., Грищан І. І., Циповяз С. В. приймали участь у проведенні досліджень).

18. Sirman Ya. V., Savytskyi I. V. Research of changes in the level of vascular endothelial growth factor in experimental diabetic retinopathy. comparison of methods of correction. *Journal of Education, Health and Sport*. 2021. Vol. 11, № 4. P. 247–257. (Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку. Співавтор проф. Савицький І. В. надавав консультативну допомогу).

19. Сірман Я. В., Савицький І. В. Зміни активності індукцйбельної синтази оксиду азоту при експериментальній діабетичній ретинопатії та способах її корекції. *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії*. 2021. Т. 21, вип. 3 (75). С. 208–214. (Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку. Співавтор проф. Савицький І. В. надавав консультативну допомогу).

20. Sirman Y. V., Preis N. I., Savytskyi I. V. Results of construction of correlation fields with trend lines and determination of direction of relationships between studied indicators. *Journal of Education, Health and Sport*. 2021. Vol. 11, № 6. P. 348–361. (Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку. Співавтор проф. Савицький І. В. надавав консультативну допомогу, співавтор Прейс Н. І. приймала участь у проведенні досліджень).

21. Сірман Я. В., Прейс Н. І., Савицький І. В. Роль 2,3 діфосфогліцерату еритроциту у патогенезі експериментальної діабетичної ретинопатії. Аналіз способів корекції. *Актуальні проблеми транспортної медицини*. 2021. № 1 (63). С. 92–106. (Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку. Співавтор проф. Савицький І. В. надавав консультативну допомогу, співавтор Прейс Н. І. приймала участь у проведенні досліджень).

22. Sirman Y. V., Savytskyi I. V., Blavatska O. M. Dynamic of blood glucose levels in the model of experimental diabetic retinopathy and different ways to correct it. *Journal of Education, Health and Sport*. 2021. Vol. 11, № 07. P. 366–373. (Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й

узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку. Співавтор проф. Савицький І. В. надавав консультативну допомогу, співавтор Блавацька О. М. приймала участь у проведенні досліджень).

23. Sirman Y. V., Preis N. I., Savytskyi I. V. Research of changes in the level of endothelin-1 in experimental diabetic retinopathy. Comparison of methods of correction. *Journal of Education, Health and Sport*. 2021. Vol. 11, № 10. P. 411–422. (Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку. Співавтор проф. Савицький І. В. надавав консультативну допомогу, співавтор Прейс Н. І. приймала участь у проведенні досліджень).

24. Dynamic of changes in the level of Interleukin 1B against the background of the development of experimental diabetic retinopathy and under the influence of various methods of correction / Y. V. Sirman, I. V. Savytskyi, N. I. Preys, O. M. Blavatska. *Journal of Education, Health and Sport*. 2022. Vol. 12, № 1. P. 493–502. (Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку. Співавтор проф. Савицький І. В. надавав консультативну допомогу, співавтор Прейс Н. І., Блавацька О. М. приймали участь у проведенні досліджень).

25. Bioflavonoids complex using in the prevention and treatment of diabetes complications / I. I. Hrytsan, I. V. Savytskyi, V. M. Sarakhan, Ya. V. Sirman, N. I. Preys, N. S. Badiuk. *PharmacologyOnLine*. 2020. Vol. 3. P. 279–283. (SCOPUS) (Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку. Співавтор проф. Савицький І. В. надавав консультативну допомогу, співавтор Грицан І. І., Прейс Н. І., Сарахан В. М. приймали участь у проведенні досліджень).

26. Savytskyi I. V., Sirman Ya. V. Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Актуальні проблеми експериментальної та клінічної біохімії* : матеріали міжнародної наук.-практ. конф., 11–12 квітня 2019 р. Харків : ХНМУ, 2019. С. 15. (Здобувачем проведено експериментальне дослідження, підготовано тези до друку)

27. Савицький І. В., Сірман Я. В. Роль дисфункції ендотелію у патогенезі діабетичних ретинопатій. *Шевальовські читання 19* : зб. праць наук.-практ. конф., 20–21 червня 2019 р. Запоріжжя, 2019. С. 51–52. (Здобувач особисто провела дослідження, здійснила узагальнення матеріалу, написання тез).

28. Sirman Ya. V., Savytskyi I. V. Pathogenesis of the changes in structure and functions of vessels due to diabetic retinopathy. *XVIII–і читання В. В. Підвисоцького* : Бюлетень матеріалів наук.-практ. конф., 21–22 травня 2019 р. Одеса : УкрНДІ медицини транспорту, 2019. С. 13–14. (Здобувач особисто провела дослідження, написання тез)

29. Sirman Ya. V., Savytskyi I. V. Modern views on pathogenesis of diabetic retinopathy. *Сучасні уявлення щодо патогенезу запалення: місцеві та системні механізми* : зб. матеріалів наук.-практ. конф. з міжнар. участю Галицькі читання,

19 вересня 2019 р. Івано-Франківськ, 2019. С. 80–81. *(Здобувачем проведено експериментальне дослідження, підготовано тези до друку)*

30. Sirman Ya. V., Savytskyi I. V. Markers of function status of vessels endothelium in experimental diabetic retinopathy. *Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція* : тези доп. II наук.-практ. інтернет-конф. з міжнар. участю, 21 листопада 2019 р. Харків : Вид-во НФаУ, 2019. С. 44–45. *(Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати)*.

31. Sirman J. V., Savytskyi I. V. Investigation of pro-antioxidant and antioxidant systems changes in experimental diabetic retinopathy. *Філатовські читання – 2019* : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 23–24 травня 2019 р. Одеса : Чорномор'я, 2019. С. 148. *(Здобувачем проведено експериментальне дослідження, підготовано тези до друку)*.

32. Savytskyi I. V., Sirman Ya. V. Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Філатовські читання – 2019* : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 23–24 травня 2019 р. Одеса : Чорномор'я, 2019. С. 149–150. *(Здобувачем проведено експериментальне дослідження, підготовано тези до друку)*

33. Сірман Я. В., Савицький І. В. Функціональні зміни ендотелію при діабетичній ретинопатії експериментального цукрового діабету. *Фізіологічні та клінічні аспекти ендокринної патології* : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 17-18 жовтня 2019 р. Яремче, 2019. С. 58–59. *(Здобувачем проведено експериментальне дослідження, аналіз літературних даних, підготовано тези до друку)*

34. Sirman Ya. V., Savytskyi I. V. Function status markers of vessels endothelium in experimental diabetic retinopathy. *Патологічна фізіологія – охороні здоров'я України* : тези доп. VIII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю, 13–15 травня 2020 р. Одеса : УкрНДІ медицини транспорту, 2020. Т. 1. С. 25. *(Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати)*

35. Sirman Ya. V., Savytskyi I. V. Some aspects of pathogenesis diabetic retinopathy. *Патологічна фізіологія – охороні здоров'я України* : тези доп. VIII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю, 13–15 травня 2020 р. Одеса : УкрНДІ медицини транспорту, 2020. Т. 1. С. 300–301. *(Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати)*

36. Розвиток ендотеліальної дисфункції при ускладненнях експериментального цукрового діабету / Я. В. Сірман, І. В. Савицький, І. І. Грицан, В. М. Сарахан. *Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм* : матеріали наук.-практ. конф., 29–30 жовтня 2020 р. Тернопіль, 2020. С. 94. *(Здобувачем проаналізовано джерела літератури, проведено дослідження, описано й узагальнено результати)*