

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
„ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО”**

ЧЕРНУХІНА ОЛЕНА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 615.272.4–06:616.36+616.61]–02:616.379–008.64

**ВПЛИВ ПОПЕРЕДНИКІВ ТА БЛОКАТОРІВ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ НА
ПАТОГЕНЕТИЧНІ ЛАНКИ УРАЖЕННЯ ПЕЧІНКИ ТА НИРОК
ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ
(експериментальне дослідження)**

14.03.04 – патологічна фізіологія

**АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук**

Тернопіль – 2011

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у державному вищому навчальному закладі „Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського” МОЗ України.

Науковий керівник: Заслужений діяч науки і техніки України, доктор медичних наук, професор **Швед Микола Іванович**, державний вищий навчальний заклад „Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського” МОЗ України, завідувач кафедри внутрішньої медицини № 1.

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук, професор **Хара Марія Романівна**, державний вищий навчальний заклад „Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського” МОЗ України, завідувач кафедри патологічної фізіології;

доктор медичних наук **Нещерет Олександр Павлович**, державна установа „Інститут ендокринології та обміну речовин імені В.П. Комісаренка НАМН України”, провідний науковий співробітник лабораторії епідеміології цукрового діабету.

Захист відбудеться 29 вересня 2011 р. о 13 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 58.601.01 у державному вищому навчальному закладі „Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського” МОЗ України (46001, м. Тернопіль, Майдан Волі, 1).

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці державного вищого навчального закладу „Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського” МОЗ України (46001, м. Тернопіль, вул. Січових Стрільців, 8).

Автореферат розісланий 12 серпня 2011 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради
доктор біологічних наук, професор

І.М. Кліщ

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Стрімке зростання захворюваності на цукровий діабет, за визначенням ВООЗ, набуло характеру неінфекційної епідемії XXI століття (Б.Н. Маньковский, 2000; Н.Д. Тронько, 2003). Поширеність, хронічний перебіг, рання інвалідизація, високий рівень смертності – все це ставить цукровий діабет в один ряд з такими катастрофічними недугами, як СНІД та онкологічні захворювання (Н.Д. Тронько, 2003). В Україні зареєстровано майже 1 млн. хворих на цукровий діабет (близько 2 % всього населення), хоча епідеміологічними дослідженнями доведено, що їх реальна кількість є у 2-3 рази більшою.

Макро- та мікроангіопатії, характерні для даного захворювання, призводять до істотного порушення функціонування внутрішніх органів, виникнення різноманітних ускладнень і нерідко стають причиною смерті пацієнтів (А.С. Ефимов и др., 2004). Зокрема, частота розвитку діабетичної нефропатії коливається від 40 % до 50 % у хворих на діабет 1 типу та від 15 % до 30 % – на діабет 2 типу, причому саме це ускладнення є однією з головних причин смерті хворих на цукровий діабет 1 типу (В.Г. Лизогуб, Н.Є. Полюх, 2006; Xilin Yang et al., 2008), а при діабеті 2 типу від уремії помирає до 8 % пацієнтів (А.С. Аметов и др., 2005). Встановлено також, що ризик серцево-судинних катастроф, як провідної причини смертності хворих на цукровий діабет, зростає при ураженні нирок (М.В. Шестакова и др., 2005; J. Escobedo et al. 2010). Тому ефективне попередження та сповільнення прогресування нефропатії при цукровому діабеті напряму зв'язане з покращанням якості життя та зменшенням рівня смертності пацієнтів (Y. Aso, 2008; F. Turgut, W. K. Bolton, 2010). Поширеність уражень печінки при цукровому діабеті також значна: гепатопатії зустрічаються у 24-88 % хворих (В.М. Хворостінка, Т.А. Моїсеєнко, 2002; А.И. Садик Джарадат, 2007). Незважаючи на те, що вони відзначаються субклінічним перебігом і лише у 4-7,5 % випадків проявляються типовими для уражень печінки скаргами, встановлено, що при ускладненні цукрового діабету гепатопатією спостерігаються більш глибокі метаболічні розлади, порівняно з групою хворих, в яких вона відсутня. Крім того, доведено, що ураження печінки у хворих на цукровий діабет є предиктором кардіо-васкулярних ускладнень, незалежно від наявності класичних факторів ризику (G. Targher et al., 2007; M.G. Sanal, 2008). Більше того, між формуванням гепатопатії та тяжкістю перебігу цукрового діабету існує взаємообтяжуючий зв'язок з утворенням хибного кола і лише включення до технології лікування ефективної гепатотропної терапії здатне розірвати ланцюг цих патологічних змін (Ю.М. Колесник та ін., 2005).

Макро- та мікроангіопатії при цукровому діабеті значною мірою пов'язані з ендотеліальною дисфункцією (А.С. Ефимов и др., 2004; V.K. Capellini et al., 2010). Однією з вазоактивних сполук, яка виробляється в організмі, в тому числі у клітинах ендотелію, з амінокислоти L-аргініну під впливом ферменту NO-синтази, є оксид азоту (NO) (В.Г. Граник, 2003; А.В. Бабушкина, 2009). В останнє десятиліття спостерігається збільшення кількості експериментальних та клінічних

досліджень ролі системи L-аргінін – NO у розвитку ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті та його ускладненнях (J. Calles–Escandon et al., 2001; A. Shahab, 2006; H. Imrie et al., 2010; N. Toda et al., 2010). Встановлено позитивний вплив прекурсорів синтезу NO на порушення, які спостерігаються при цукровому діабеті (R. Kohli et al., 2004; W.J. Fu et al., 2005; D. McGrowder et al., 2006; V. Calderone et al., 2009). Проте, кількість спостережень, які стосуються взаємозв'язку між рівнем утворення NO, зокрема на тлі застосування модуляторів його синтезу, та проявами діабетичної гепато- та нефропатії, є обмеженою, а їх зміст нерідко має суперечливий характер (I.B. Бродяк, Н.О. Сибірна, 2006; Н. Сибірна та ін., 2006; M.B. West et al., 2008). Не проводилось комплексне порівняльне вивчення впливу попередників синтезу NO та блокаторів NO-синтази на біохімічні та структурні показники стану печінки та нирок при стрептозотоциновому діабеті. Відсутні дані про особливості впливу модуляторів утворення NO на патогенетичні ланки ураження цих органів залежно від їх призначення у різні стадії розвитку експериментального цукрового діабету. Здійснення таких досліджень сприятиме розширенню існуючих уявлень про роль системи L-аргінін – NO у патогенезі діабетичних гепато- та нефропатії та науковому обґрунтуванню доцільності застосування прекурсорів NO як засобів корекції ускладнень цукрового діабету.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом комплексних науково-дослідних тем Тернопільського державного медичного університету "Роль змін активності системи оксиду азоту в патогенезі гіпоксичних станів різної етіології і пошук способів фармакологічної корекції" (№ держреєстрації 0104U004519) та "Вплив попередників та інгібіторів синтезу оксиду азоту на перебіг метаболічних процесів при патологічних станах різного генезу" (№ держреєстрації 0107U004456). Дисертант є співвиконавцем названих тем. Тема дисертації затверджена Проблемною комісією МОЗ України та НАМН України „Нормальна і патологічна фізіологія” 20 жовтня 2010 року (протокол № 2).

Мета дослідження. З'ясувати особливості впливу попередників синтезу оксиду азоту (L-аргініну та L-аргініну-L-глутамату) та блокаторів NO-синтази (N-нітро-L-аргініну та аміногуанідину) на окремі патогенетичні ланки ураження печінки та нирок при експериментальному цукровому діабеті та розробити методику попередження розвитку і прогресування даного патологічного процесу.

Завдання дослідження.

1. Встановити структурно-функціональні зміни печінки та нирок у щурів при експериментальному цукровому діабеті, викликаному стрептозотоцином.
2. Дослідити особливості впливу прекурсорів синтезу оксиду азоту L-аргініну та L-аргініну-L-глутамату (при їх уведенні з 15 по 28 добу експерименту) на патогенетичні ланки ураження печінки та нирок при стрептозотоциновому діабеті.

3. Встановити особливості впливу інгібітора NO-синтази неселективної дії N-нітро-L-аргініну та блокатора індукцйбельної ізоформи ферменту аміногуанідину (при їх уведенні з 15 по 28 добу експерименту) на патогенетичні ланки ураження печінки та нирок при стрептозотоциновому діабеті.

4. Провести порівняльний аналіз впливу попередника синтезу оксиду азоту L-аргініну-L-глутамату та блокатора цього процесу аміногуанідину (при їх уведенні з 2 по 28 добу експерименту) на патогенетичні ланки ураження печінки та нирок при стрептозотоциновому діабеті.

5. Встановити особливості впливу L-аргініну-L-глутамату на патогенетичні ланки ураження печінки та нирок при стрептозотоциновому діабеті при його комбінованому застосуванні з блокатором NO-синтази аміногуанідином (при їх уведенні з 15 по 28 добу експерименту).

6. Визначити ефективність L-аргініну-L-глутамату як засобу корекції ураження печінки та нирок при стрептозотоциновому діабеті та дослідити роль стимуляції синтезу оксиду азоту в реалізації його гепато- та нефропротекторної активності.

Об'єкт дослідження. Стрептозотоциновий цукровий діабет у щурів.

Предмет дослідження. Особливості патогенезу ураження печінки та нирок при стрептозотоциновому цукровому діабеті та можливість його корекції модуляторами синтезу оксиду азоту.

Методи дослідження: біохімічні – для вивчення ступеня порушень вуглеводного обміну, систем прооксиданти-антиоксиданти та мітохондріального транспорту електронів у печінці та нирках, маркерних показників їх ураження у сироватці крові, для оцінки рівня синтезу оксиду азоту при стрептозотоциновому діабеті та в процесі корекції попередниками та блокаторами цього процесу; морфологічні – для оцінки структурних змін у печінці та нирках при діабеті та під впливом засобів корекції; статистичні – для обробки цифрових даних методом варіаційної статистики з використанням критерію Стюдента і оцінки результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше доведено, що гепато- та нефропатія при стрептозотоциновому діабеті, яка проявляється наростанням у сироватці крові біохімічних маркерів ураження печінки та нирок, патологічними змінами гістологічної структури цих органів, порушенням у них прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу, дискоординацією функцій електронно-транспортного ланцюга мітохондрій, розвивається на тлі пригнічення синтезу у їх тканині оксиду азоту.

Уперше встановлено, що L-аргініну-L-глутамат проявляє захисну дію і зменшує прояви ураження печінки та нирок при стрептозотоциновому діабеті з одночасним зниженням рівнів гіперглікемії та глікозильованого гемоглобіну в крові експериментальних тварин. Позитивний вплив L-аргініну-L-глутамату на стан внутрішніх органів при стрептозотоциновому діабеті

спостерігається як при його введенні з 15 по 28 добу експерименту (у період стабілізації патологічного процесу), так і, більшою мірою, у випадку, коли його застосування проводиться протягом всього періоду дослідження (з 2 по 28 добу експерименту).

Уперше з'ясовано, що у механізмах позитивного впливу L-аргініну-L-глутамату на структуру та функцію печінки і нирок при стрептозотоциновому діабеті, поряд з антиоксидантними властивостями, відіграє роль його здатність стимулювати синтез оксиду азоту. Останнє підтверджується встановленими даними про позитивний вплив іншого прекурсора синтезу NO – L-аргініну при цій патології та фактом прогресування виявлених структурних та функціональних порушень у печінці та нирках при стрептозотоциновому діабеті під впливом інгібіторів NO-синтази: аміногуанідину та, особливо, N-нітро-L-аргініну.

Уперше встановлено факт зменшення позитивного впливу L-аргініну-L-глутамату на стан печінки та нирок при стрептозотоциновому діабеті при його комбінованому застосуванні з блокатором індукбельної NO-синтази аміногуанідином, що підтверджує важливість стимуляції синтезу оксиду азоту у реалізації гепато- та нефропротекторних властивостей L-аргініну-L-глутамату.

Практичне значення одержаних результатів. Встановлено позитивний вплив прекурсорів та негативний вплив інгібіторів синтезу оксиду азоту на патогенетичні ланки ураження печінки та нирок при стрептозотоциновому цукровому діабеті, що поглиблює існуючі уявлення про механізми uszkodження внутрішніх органів при даному патологічному процесі. Доведення ефективності попередника синтезу оксиду азоту L-аргініну-L-глутамату при його застосуванні для корекції ураження печінки та нирок при стрептозотоциновому діабеті науково обґрунтовує доцільність та перспективність поглибленого вивчення прекурсорів синтезу оксиду азоту як засобів для профілактики та лікування діабетичної гепато- та нефропатії.

Отримані результати можуть бути використані при вивченні курсів патологічної фізіології, ендокринології, фармакології, патоморфології. Результати досліджень впроваджено у навчальний процес на кафедрах патологічної фізіології у Дніпропетровській державній медичній академії, Буковинському державному медичному університеті, ДЗ “Луганський державний медичний університет”, Вінницькому національному медичному університеті імені М.І. Пирогова, Запорізькому державному медичному університеті, ДВНЗ “Івано-Франківський національний медичний університет”, ДУ “Кримський державний медичний університет ім. С.І. Георгієвського”, ДВНЗ „Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського”, Одеському національному медичному університеті, ВДНЗ України „Українська медична стоматологічна академія”, Харківському національному медичному університеті, у наукові дослідження ДУ “Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України”.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно проведено пошук та аналіз

вітчизняних і зарубіжних інформаційних джерел відповідно до теми дослідження, опановано та виконано експериментальні методики, здійснено статистичний аналіз отриманих результатів, написано усі розділи дисертації. Біохімічні та морфологічні дослідження було здійснено спільно з працівниками Лабораторії доклінічних досліджень лікарських засобів, акредитованої Державним фармакологічним центром МОЗ України (Посвідчення № 2 від 27.04.2006 р.) та атестованої МОЗ України (Атестат № 00474 від 16.12.2007 р.) та навчально-наукового інституту морфології Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського, за що автор висловлює їм щирю подяку.

Разом із науковим керівником було сформульовано мету і завдання наукових досліджень, обґрунтовано висновки. У всіх наукових працях, що містять результати дисертаційних досліджень, у тому числі й тих, що опубліковані в співавторстві, використано фактичний матеріал, отриманий дисертантом у процесі виконання роботи. У тій частині актів впровадження, що стосується науково-практичної новизни, викладено дані, отримані автором при виконанні дисертаційного дослідження.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень, отримані в процесі виконання дисертаційної роботи, оприлюднені на III Національному з'їзді фармакологів України „Фармакологія 2006 – крок у майбутнє” (Одеса, 2006), Всеукраїнській науково-практичній конференції „Здобутки та перспективи внутрішньої медицини” (Тернопіль, 2006), XLIX, L та LI підсумкових науково-практичних конференціях „Здобутки клінічної і експериментальної медицини (Тернопіль, 2006, 2007, 2009), X, XIII та XIV Міжнародних медичних конгресах студентів і молодих вчених (Тернопіль, 2006, 2009, 2010), науково-практичній конференції „Роль месенджерних систем у патогенезі патологічних процесів різної етіології” (Тернопіль, 2007), 1-й, 2-й та 3-й науково-практичних конференціях „Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм” (Тернопіль, 2008, 2009, 2010), Всеукраїнській науково-практичній конференції “Сучасний стан та перспективи розвитку доказової медицини у вітчизняній охороні здоров'я” (Тернопіль, 2009).

Публікації. Результати досліджень, викладених у дисертації, знайшли відображення у 22 наукових працях, з яких 7 опубліковано у фахових виданнях, рекомендованих ВАК України (у тому числі 2 – одноосібні), 15 – у матеріалах і тезах наукових конференцій, з'їздів, конгресів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, семи розділів, висновків, списку використаних джерел, додатків (актів впровадження). Дисертація викладена на 186 сторінках комп'ютерного тексту, ілюстрована 21 таблицею, 20 рисунками. У списку використаних джерел – 279 найменувань, у тому числі 82 – кирилицею та 197 – латиницею. Бібліографічний опис літературних джерел і додатки займають 44 сторінки.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження. Досліди проведено на 148 білих нелінійних щурах-самцях з масою тіла 120-150 г. Усіх тварин утримували на стандартному раціоні віварію. Дослідження виконували відповідно до „Загальних етичних принципів експериментів на тваринах”, ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) та узгоджених з положеннями “Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей” (Страсбург, 1986). Комісією з біоетики ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського” порушень морально-етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено (протокол № 3 від 15 жовтня 2010 р.).

Цукровий діабет моделювали одноразовим інтраперитонеальним введенням стрептозотоцину (STZ, “Sigma”, США) у дозі 50 мг/кг маси тіла тварини (M.L. Onozato et al., 2002). Використовували такі модулятори синтезу NO при STZ-Д: попередники – L-аргінін (“Sigma”, США; 25 мг/кг) та L-аргініну-L-глутамат (глутаргін, фармацевтична компанія “Здоров’я”, м. Харків; 45 мг/кг), блокатор NO-синтази неселективної дії N-нітро-L-аргінін (“Oldrich. Chem. Co.”, Англія; 10 мг/кг), блокатор індучибельної ізоформи NO-синтази аміногуанідин (ООО „Химлаборатор-реактив”, Київ; 10 мг/кг). Зазначені речовини вводили інтраперитонеально щоденно з 15 по 28 добу експерименту. Частині тварин з STZ-Д вводили L-аргініну-L-глутамат та аміногуанідин з 2 по 28 добу досліду (розпочинали з наступного дня після ін’єкції STZ). Досліджували також результати комбінованого застосування L-аргініну-L-глутамату та аміногуанідину з 15 по 28 добу експерименту. Тваринам контрольної групи вводили аналогічний об’єм розчинника. Усі дослідження проводили на 29 добу від моменту введення STZ, на стадії розгорнутого STZ-Д (Ю.М. Колесник та ін., 2005). Реєстрували рівень загибелі експериментальних тварин та динаміку маси їх тіла в процесі експерименту. Про ступінь порушень вуглеводного обміну при STZ-Д робили висновок за вмістом у крові глюкози (В.С. Камышников, 2004) та глікозильованого гемоглобіну – HbA1C (V. Chromy et al., 1986). Також визначали у сироватці крові вміст ТБК-активних продуктів (ТБП) (Л.И. Андреева и др., 1988), креатиніну та сечовини (з використанням стандартного набору реактивів АТ „Реагент”), активність АлАТ та АсАТ (S. Reitman, S.A. Frenkel, 1957), лужної фосфатази (В.Г. Колб, В.С. Камышников, 1976), каталази (М.А. Королюк та ін., 1988), тимолову пробу (В.С. Камышников, 2004). Про рівень синтезу NO робили висновок за вмістом у крові та досліджуваних органах його стабільного метаболіту нітрит-аніону – NO_2^- (L. Green et al., 1982; Е.А. Орлова, 2002). Активність пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) у печінці та нирках аналізували за вмістом гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) (В.Б. Гаврилов, М.И. Мишкорудная, 1983) та ТБП (Л.И. Андреева и др., 1988), антиоксидантної системи – за активністю супероксиддисмутази (СОД) (С. Чевари та ін., 1985), каталази (М.А. Королюк и

др., 1988) та вмістом відновленого глутатіону (GSH) (G. Ellman, 1959; J. Sedlack, H. Lindsay, 1968). Для аналізу окиснювальних процесів у мітохондріях печінки та нирок визначали активність сукцинатдегідрогенази (СДГ) (Н.Д. Ещенко, Г.Г. Вольский, 1982) та цитохромоксидази (ЦХО) (Р.С. Кривченкова, 1977). Ступінь структурних порушень у печінці та нирках оцінювали за результатами світлової оглядової мікроскопії гістологічних препаратів цих органів.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням середнього арифметичного (M), похибки середнього арифметичного (m), критерію Стюдента (t). Зміни вважали достовірними при $p \leq 0,05$. Для розрахунків використовували комп'ютерну програму Microsoft Excel XP (США).

Результати досліджень та їх обговорення. Першим етапом дослідження стало з'ясування рівня загибелі тварин, динаміки маси їх тіла, біохімічних показників, які характеризують порушення вуглеводного обміну та стан печінки і нирок, змін їх гістологічної структури при STZ-Д. Встановили, що у цій групі загинуло 20 % тварин, на 18 % зменшувався приріст маси тіла щурів впродовж 28 днів експерименту, порівняно з контролем. При STZ-Д відбувалось зростання у крові рівнів глюкози у 3,1 раза (з $6,53 \pm 0,18$ ммоль/л до $21,79 \pm 1,00$ ммоль/л), HbA1C в 1,8 раза (з $5,81 \pm 0,25$ абс. % до $10,28 \pm 0,54$ абс. %), маркерних показників ураження печінки та нирок, зокрема АлАТ – на 34 %, АсАТ – на 42 %, лужної фосфатази – на 64 %, тимолової проби – на 29 %, сечовини – на 46 %, креатиніну – на 9 % (рис. 1).

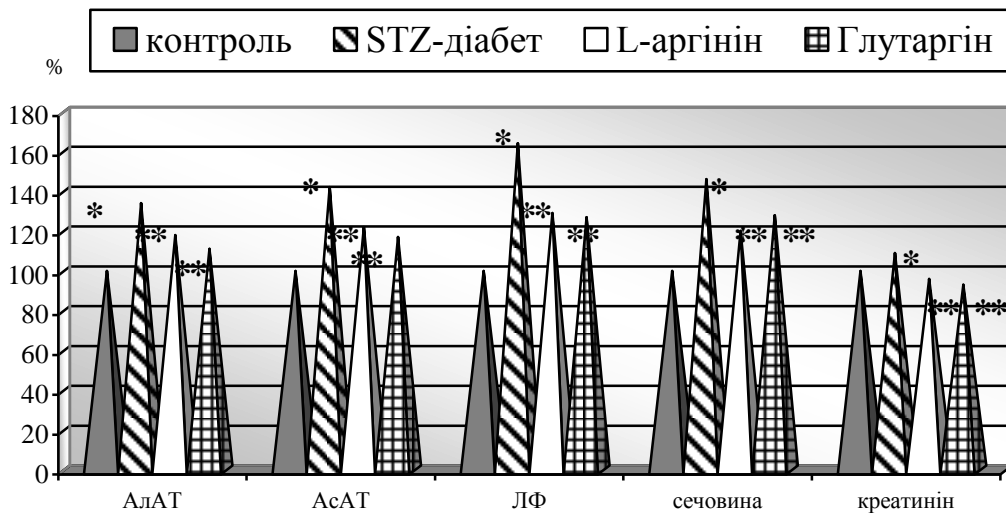


Рис. 1. Біохімічні показники – маркери ураження печінки та нирок у крові щурів із стрептозотоциновим діабетом та їх динаміка при корекції L-аргініном та L-аргініну-L-глутаматом (глутаргінном).

У печінці тварин з STZ-Д спостерігались активація процесів пероксидного окиснення ліпідів з наростанням вмісту ГПЛ та ТБП (на 28 та 85 % відповідно), компенсаторне підвищення активності СОД та каталази (на 33 та 14 %), зниження рівня GSH (на 25 %), активності СДГ та

ЦХО мітохондрій (на 24 та 18 %) (табл. 1).

Таблиця 1

Показники стану печінки щурів при стрептозотоциновому діабеті та їх динаміка при корекції L-аргініном та L-аргініну-L-глутаматом при їх окремому введенні з 15 по 28 добу експерименту(M±m)

Показник	Група тварин			
	Контроль (n=6)	STZ-Д (n=8)	STZ-Д + L-ар- гінін (n=10)	STZ-Д + L-аргініну-L- глутамат (n=10)
ГПЛ, 10 ³ ум.од. /кг	4,32±0,06	5,53±0,05 *	4,66±0,05 *#	4,44±0,06 #
ТБП, ммоль/кг	4,56±0,04	8,44±0,30 *	6,62±0,19 *#	6,36±0,30 *#
СОД, ум.од.	2,07±0,07	2,74±0,06 *	2,47±0,07 *#	1,94±0,05 #
Кат, кат/кг	12,75±0,62	15,08±0,48 *	12,55±0,22 #	12,61±0,13 #
G-SH, ммоль/кг	5,34±0,13	4,03±0,09 *	4,67±0,14 *#	5,09±0,11 #
СДГ, ммоль/(кг·хв.)	8,87±0,29	7,09±0,20 *	7,85±0,16 *#	8,11±0,23 #
ЦХО, ммоль/(кг·хв.)	5,98±0,14	4,84±0,10 *	4,40±0,08 *#	5,67±0,04 #
NO ₂ ⁻ , мкмоль/кг	1,17±0,07	0,93±0,02 *	1,59±0,07 *#	1,67±0,02 *#

Примітка. Достовірність позначено: * – відносно контролю, # – відносно STZ-Д.

При дослідженні біохімічних показників стану нирок у тварин із STZ-Д зареєстровані зміни, односпрямовані з тими, які відмічались у печінці (рис. 2).

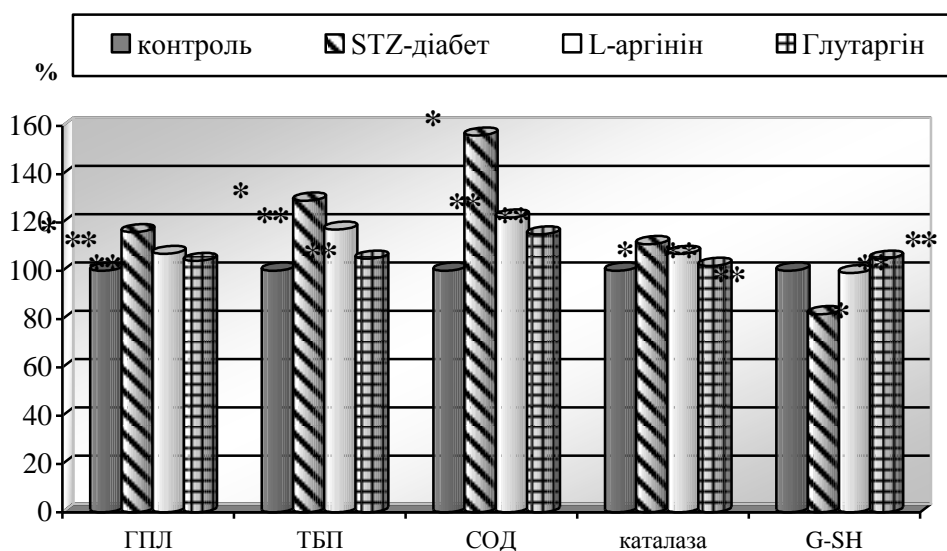


Рис. 2. Показники пероксидного окиснення ліпідів та антиоксидантної системи у нирках при STZ-діабеті та їх динаміка при корекції L-аргініном та L-аргініну-L-глутаматом (глутаргінном) при їх окремому введенні з 15 по 28 добу експерименту.

Зокрема, були вищими, ніж у контролі, вміст ГПЛ та ТБП – на 16 та 29 %, активність СОД і каталази – на 56 і 11 %, але зменшувався вміст GSH на 18 %. Гальмувалась активність СДГ та ЦХО відповідно на 20 та 8 %, порівняно з контролем.

Вказані зміни відбувались на тлі зменшення вмісту NO_2^- – на 22 % у печінці та на 17 % у нирках (табл. 1), що опосередковано свідчило про пригнічення утворення в органах NO. Відомо, що за кількістю NO_2^- , який є стабільним метаболітом NO, можна робити висновки про рівні експресії NO-синтази та синтезу NO у тканинах організму (Е.А. Орлова, 2002; В.П. Реутов, 2002).

У рисунках 1-3 достовірність позначено: * – відносно контролю, ** – відносно STZ-Д; величина показників у контролі прийнята за 100 %.

При дослідженні гістологічної структури органів тварин з STZ-Д у печінці відмічались дистрофічно-некротичні зміни централобулярних гепатоцитів у поєднанні з дифузною інтерстиціальною лімфогістіоцитарною інфільтрацією. У нирках спостерігались явища фокальної гіаліново-крапельної та вакуольної дистрофії з некрозом окремих клітин у проксимальних відділах каналців та субатрофією епітеліальних клітин – у дистальних каналцях, набрякання строми кіркової і мозкової речовини з вогнищами лімфоїдно-клітинної інфільтрації.

Відповідно до даних літератури, у розвитку ендотеліальної дисфункції – основної ланки патогенезу ускладнень при цукровому діабеті – важливу роль відіграють спричинені різними механізмами зменшення синтезу, зростання деградації NO та пригнічення біодоступності його прекурсора L-аргініну (А. Kabat, S. Dhein, 2006; W. Z. Zhang et al., 2008; М.А. Potenza, 2009). Тому наступним етапом досліджень стало вивчення впливу попередників синтезу NO L-аргініну та L-аргініну-L-глутамату при їх введенні з 15 по 28 добу експерименту на стан печінки та нирок при STZ-Д. Встановлено, що при застосуванні зазначених речовин тварини не гинули, приріст їх маси за 28 діб становив 36 та 30 % (у щурів з STZ-Д без корекції – 13 %). L-аргінін та L-аргініну-L-глутамат сприяли зменшенню рівня гіперглікемії на 14 та 22 %. Рівні АЛАТ, АсАТ, ЛФ, сечовини та креатиніну у сироватці крові були нижчими, ніж у тварин з STZ-Д, відповідно на 16, 20, 35, 26 та 13 % – при корекції L-аргініном і на 23, 25, 37, 18 та 16 % – при введенні L-аргініну-L-глутамату. Причому у щурів, яким вводили попередники синтезу NO, активність маркерних ферментів цитолізу та холестазу, рівень креатиніну не відрізнялись від контрольних значень (див. рис. 1). Отримані результати підтверджувались дослідженням активності та вмісту компонентів систем прооксиданти-антиоксиданти та мітохондріального транспорту електронів у печінці та нирках. У групі тварин з STZ-Д, яким вводили L-аргінін, вміст ГПЛ, ТБП, активність СОД та каталази у печінці були меншими, ніж у щурів без такої корекції, відповідно на 16, 22, 10 та 17 %, при введенні L-аргініну-L-глутамату – на 20, 25, 29 та 16 % (див. табл. 1). Попередники синтезу NO сприяли тому, що у печінці вміст GSH був на 16 та 26 % більшим, порівняно з групою щурів з

STZ-Д, які не отримували дані препарати. Причому на тлі корекції L-аргініну-L-глутаматом зазначені показники не відрізнялись від аналогічних контрольної групи тварин.

Редукцію проявів оксидативного стресу, покращання показників системи мітохондріального транспорту електронів під впливом прекурсорів синтезу NO було відмічено і у тканині нирок. При цьому у групі щурів, яким впродовж 2 тижнів експерименту вводили L-аргініну-L-глутамат, вміст у нирках ГПЛ, ТБП, активність СОД, каталази, рівні GSH, СДГ та ЦХО не відрізнялись від аналогічних показників контрольних тварин (див. рис. 2). Дещо меншу активність проявляв L-аргінін, при введенні якого на вихідному рівні знаходились лише показники СОД, GSH, СДГ.

Зазначені позитивні зміни стану печінки та нирок при STZ-Д під впливом попередників утворення NO супроводжувались зростанням у гомогенатах органів вмісту NO_2^- : у печінці – на 71 і 81 % при введенні L-аргініну та L-аргініну-L-глутамату, у нирках – на 69 і 80 % відповідно.

При дослідженні гістологічної структури органів на тлі застосування L-аргініну-L-глутамату відмічено зменшення дистрофічних та дистрофічно-некротичних змін печінкової паренхіми, нормалізацію структури гепатоцитів, особливо у середній частині печінкової часточки, у нирках – зменшення у кірковій речовині явищ дистрофії ендотелію клубочків, набряку та лімфо-гістіоцитарної інфільтрації стромальних елементів інтерстиційної тканини.

Протилежні закономірності отримано при вивченні впливу на стан печінки та нирок при STZ-Д блокаторів NOS при їх введенні з 15 по 28 добу експерименту (табл. 2).

Таблиця 2

Показники стану печінки щурів при STZ-діабеті та їх динаміка при введенні N-нітро-L-аргініну та аміногуанідину з 15 по 28 добу експерименту ($M \pm m$)

Показник	Група тварин			
	STZ-Д (n=8)	STZ-Д+ N-нітро-L- аргінін (n=6)	STZ-Д (n=8)	STZ-Д+ аміногуанідин (n=9)
ГПЛ, 10^3 ум.од. /кг	5,62±0,06*	6,63±0,06*#	5,53±0,05*	6,17±0,05*#
ТБП, ммоль/кг	7,80±0,19*	9,53±0,08*#	8,44±0,30*	8,85±0,28*
СОД, ум.од.	2,82±0,07*	3,22±0,09*#	2,74±0,06*	3,05±0,06*#
Каталаза, кат/кг	14,52±0,26*	15,97±0,24*#	15,09±0,48*	15,1±0,16*
G-SH, ммоль/кг	4,21±0,06*	3,35±0,11*#	4,03±0,09*	3,62±0,13*#
СДГ, ммоль/(кг·хв.)	6,79±0,22*	9,02±0,25#	7,09±0,20*	8,71±0,27#
ЦХО, ммоль/(кг·хв.)	5,06±0,14*	4,76±0,07*	4,85±0,10*	4,75±0,01*
NO_2^- , мкмоль/кг	0,91±0,05*	0,52±0,04*#	0,93±0,02*	0,69±0,04*#
Примітка. Достовірність позначено: * – відносно контролю, # – відносно STZ-Д.				

При застосуванні N-нітро-L-аргініну та аміногуанідину рівень загибелі щурів становив відповідно 40 і 10 %. Перша речовина сприяла зменшенню маси тіла тварин за час експерименту на 11 %, при введенні аміногуанідину показник приросту не відрізнявся від групи щурів з STZ-Д без корекції. Обидва блокатори NOS викликали подальше прогресування порушень у системі прооксиданти-антиоксиданти у досліджуваних органах, що особливо яскраво проявлялось при введенні N-нітро-L-аргініну. У цій серії відмічено збільшення у гомогенатах печінки вмісту ГПЛ та ТБП на 18 та 22 %, активності СОД та каталази – на 14 та 10 % відповідно, порівняно з аналогічними показниками у щурів з STZ-Д без корекції (див. табл. 2).

Неоднозначним виявився вплив N-нітро-L-аргініну та аміногуанідину на ферменти мітохондрій. Активність СДГ у цих серіях дослідів була вищою відповідно на 33 та 23 %, ЦХО – не змінювалась, порівняно з відповідними показниками у групі тварин з STZ-Д без корекції (див. табл. 2).

Обидва блокатори NOS поглиблювали дефіцит NO_2^- у досліджуваних органах. Зокрема, у печінці при введенні N-нітро-L-аргініну та аміногуанідину його вміст був меншим на 43 та 25 %, порівняно з показником при STZ-Д, у нирках – на 37 та 29 % відповідно (див. табл. 2). Разом з тим, при введенні аміногуанідину рівні глюкози та HbA1C у крові були на 32 і 29 % меншими, ніж у тварин з STZ-Д без корекції.

N-нітро-L-аргінін викликав погіршення структурних ознак ураження органів, що проявлялось у печінці токсикодистрофічними процесами, з частковим некрозом паренхіми різного ступеня, вогнищевим розростанням сполучної тканини, у нирках – генералізованим пошкодженням мікроциркуляторного русла, дифузним розширенням перитубулярних просторів із множинними стазами в гемокапілярах та дифузними діapedезними крововиливами, частковим зникненням нормального клубочкового та канальцевого малюнків. Ступінь негативного впливу аміногуанідину на структуру печінки та нирок при STZ-Д був дещо меншим, проте і у цій групі у печінці спостерігали дистрофічні зміни паренхіми, клітинну інфільтрацію порталних трактів, гострі розлади кровообігу, у нирках – дифузні дистрофічні зміни епітелію канальців, явища ексудації клубочків.

Наступним етапом дослідження стало порівняльне вивчення впливу на стан печінки та нирок при STZ-Д попередника синтезу NO L-аргініну-L-глутамату та блокатора індукцйбельної NOS аміногуанідину при їх окремому застосуванні з 2 по 28 добу експерименту. При цьому, ґрунтуючись на даних літератури про роль активації індукцйбельної NO-синтази та зростання утворення NO в ініціації ураження β -клітин підшлункової залози під впливом STZ (М.А. Орловский, 2004, 2006), ми припустили, що введення L-аргініну-L-глутамату на початковій стадії розвитку STZ-Д може збільшити тяжкість проявів останнього, зокрема ступінь ураження печінки

та нирок, аміногуанідин у цих умовах повинен діяти протилежним чином.

Разом з тим, встановлено, що при 4-тижневому застосуванні L-аргініну-L-глутамату при STZ-Д біохімічні маркери ураження досліджуваних органів у сироватці крові, більшість показників систем прооксиданти-антиоксиданти, мітохондріального транспорту електронів у печінці та нирках не відрізнялись від аналогічних параметрів у контрольній групі тварин (рис. 3).

Зазначений позитивний вплив L-аргініну-L-глутамату реалізувався на тлі стимуляції синтезу NO, про що свідчило наростання вмісту його стабільного метаболіту у печінці та нирках на 71 та 69 % відповідно. При 4-тижневому введенні аміногуанідину більшість досліджуваних біохімічних показників у сироватці крові, печінці та нирках не відрізнялись від аналогічних параметрів у групі тварин з STZ-Д без корекції, за винятком вмісту NO_2^- , який був нижчим в обох органах на 28 %.

Рівні глюкози та HbA1C при введенні протягом 4 тижнів L-аргініну-L-глутамату були меншими, ніж у групі щурів з STZ-Д без корекції, відповідно на 25 та 11 %, при застосуванні аміногуанідину – на 16 та 15 %.

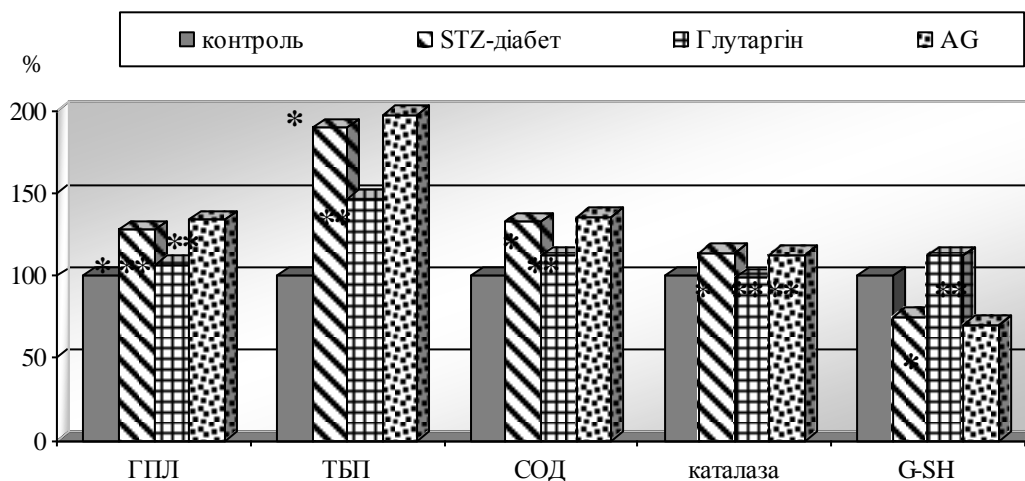


Рис. 3. Зміни показників систем прооксиданти-антиоксиданти у печінці при STZ-діабеті та окремому введенні L-аргініну-L-глутамату (глутаргін) та аміногуанідину (AG) з 2 по 28 добу експерименту.

Наступним етапом стало вивчення особливостей впливу L-аргініну-L-глутамату та аміногуанідину при їх комбінованому введенні з 15 по 28 добу експерименту на стан печінки та нирок при STZ-Д (табл. 3). Дане дослідження проводили для підтвердження позитивної ролі стимуляції утворення NO у регресії ознак гепато- та нефропатії під впливом L-аргініну-L-глутамату при цьому патологічному процесі.

Встановлено, що комбіноване застосування прекурсора та блокатора синтезу NO при ураженні печінки та нирок на тлі STZ-Д супроводжувалось погіршенням стану досліджуваних органів, порівняно з групою тварин, які отримували для корекції гепато- та нефропатії лише L-

аргініну-L-глутамат (табл. 3).

У печінці це проявлялось зростанням вмісту ГПЛ та ТБП (на 18 та 25 %), активності СОД (на 20 %), зниженням вмісту GSH (на 8 %).

Комбінування вказаних агентів також призводило до нівелювання позитивного впливу L-аргініну-L-глутамату на показники ураження нирок у сироватці крові, на активність СОД та ЦХО у тканині органа (табл. 3).

Зазначені зміни супроводжувались пригніченням синтезу NO у печінці та нирках, про що свідчив менший вміст у них NO_2^- на 78 та 100 % відповідно, порівняно з групою тварин, яким вводили L-аргініну-L-глутамат (табл. 3).

Таблиця 3

Зміни біохімічних показників у крові, печінці й нирках у щурів з STZ-діабетом та при комбінованому введенні L-аргініну-L- глутамату з аміногуанідином протягом 14 діб (M±m)

Орган	Показник	Група тварин		
		STZ-Д (n=8)	STZ-Д+L-аргініну- L-глутамат (n=10)	STZ-Д+ L-аргініну-L- глутамат+аміногуанідин (n=9)
Кров	ТБП, ммоль/л	1,61±0,03 •	1,27±0,04 *	1,80±0,03 * #
	Каталаза, кат/л	6,69±0,17 •	5,30±0,24 *	6,09±0,23 * #
	Креатинін, мкмоль/л	56,94±1,08 •	47,92±1,19 *	58,93±1,26 #
	Сечовина, ммоль/л	10,07±0,26 •	8,30±0,31 *	9,22±0,29
	АсАТ, ммоль/(л·год)	1,19±0,06 •	0,89±0,06 *	1,17±0,03 #
	ЛФ, ммоль/л	2,65±0,08 •	1,68±0,05 *	2,07±0,14 * #
	NO_2^- , мкмоль/л	2,38±0,05 •	2,84±0,10 *	2,27±0,19 #
Печінка	ГПЛ, 10^3 ум.од./кг	5,53±0,05 •	4,44±0,06 *	5,40±0,07 #
	ТБП, ммоль/кг	8,44±0,30 •	6,36±0,30 *	8,25±0,20 #
	СОД, ум.од.	2,74±0,06 •	1,94±0,05 *	2,45±0,06 * #
	ЦХО, ммоль/(кг·хв)	4,84±0,10 •	5,67±0,04 *	4,04±0,11 * #
	NO_2^- , мкмоль/кг	0,98±0,04 •	1,67±0,02 *	0,94±0,03 #
Нирки	СОД, ум.од.	1,87±0,06 •	1,09±0,04 *	1,66±0,06 * #
	ЦХО, ммоль/(кг·хв)	4,58±0,06 •	4,87±0,04 *	4,10±0,08 * #
	NO_2^- , мкмоль/кг	1,04±0,02 •	1,88±0,06 *	0,94±0,04 * #

Примітка. Достовірність позначено відносно: • – контролю, * – STZ-діабету, # – групи STZ-діабет+L-аргініну-L-глутамат.

Таким чином, ґрунтуючись на отриманих нами результатах та існуючих даних літератури, можна стверджувати, що одним із важливих компонентів патогенезу ураження печінки та нирок при стрептозотоциновому цукровому діабеті є пригнічення синтезу та біодоступності оксиду азоту, а попередники його утворення – L-аргініну-L-глутамат (глутаргін) та L-аргінін здатні зменшити рівень гіперглікемії та глікозильованого гемоглобіну еритроцитів, проявляють гепато- та нефропротекторну активність, що зв'язано з їх антиоксидантними властивостями та здатністю стимулювати синтез оксиду азоту.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення та запропоноване нове вирішення актуального наукового завдання, що полягає у встановленні ролі системи L-аргінін – оксид азоту у патогенезі ураження печінки та нирок при експериментальному цукровому діабеті та доведенні позитивного впливу попередників синтезу оксиду азоту на порушення, які виникають.

1. Стрептозотоциновий діабет через 4 тижні від початку його моделювання супроводжується зростанням у крові рівнів глюкози – у 3,1 раза ($p < 0,001$), глікозильованого гемоглобіну – в 1,8 раза ($p < 0,001$), активності аланінамінотрансферази – на 34 % ($p < 0,01$), аспаратамінотрансферази – на 42 % ($p < 0,02$), лужної фосфатази – на 64 % ($p < 0,001$), тимолової проби – на 29 % ($p < 0,01$), вмісту сечовини – на 46 % ($p < 0,001$), креатиніну на 9 % ($p < 0,02$), у печінці та нирках – активацією процесів пероксидного окиснення ліпідів, компенсаторним підвищенням активності каталази та супероксиддисмутази, зниженням рівня відновленого глутатіону, активності сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази мітохондрій, що виникають на тлі зменшення вмісту стабільного метаболіту оксиду азоту у печінці – на 22 % ($p < 0,05$), у нирках – на 17 % ($p < 0,001$), розвитку морфологічних ознак гепатопатії (дистрофічно-некротичних змін централобулярних гепатоцитів у поєднанні з дифузною інтерстиціальною лімфогістіоцитарною інфільтрацією) та нефропатії (явищ фокальної гіаліново-крапельної та вакуольної дистрофії з некрозом окремих клітин у проксимальних відділах каналців та субатрофією епітеліальних клітин – у дистальних каналцях, набрякання строми кіркової і мозкової речовини з явищами лімфоїдно-клітинної інфільтрації).

2. Прекурсор синтезу оксиду азоту L-аргініну-L-глутамат (глутаргін) при його введенні з 15 по 28 добу розвитку STZ-діабету сприяє збільшенню вмісту NO_2^- у печінці – на 81 % ($p < 0,001$), у нирках – на 80 % ($p < 0,001$), зниженню рівня гіперглікемії на 22 % ($p < 0,001$) та активності аланін- і аспаратамінотрансферази у сироватці крові, зменшенню проявів оксидативного стресу та зростанню активності сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази у досліджуваних органах, редукції гістологічних ознак їх ураження, що проявляється у печінці нормалізацією структури гепатоцитів, переважно середньої частини печінкової часточки, у нирках – зменшенням у кірковій

речовині набряку та лімфо-гістіоцитарної інфільтрації інтерстицію.

3. Гепато- та нефропротекторна активність L-аргініну-L-глутамату зростає при його застосуванні з 2 по 28 добу експерименту при STZ-діабеті, при цьому показники систем прооксиданти-антиоксиданти, мітохондріального транспорту електронів у печінці та нирках, активність та вміст маркерів ураження цих органів у сироватці крові не відрізняються від аналогічних параметрів у контрольній групі тварин, що відбувається на тлі зменшення рівнів гіперглікемії – на 25 % ($p < 0,001$) та глікозильованого гемоглобіну – на 11 % ($p < 0,05$), з одночасним збільшенням вмісту NO_2^- у печінці – на 71 % ($p < 0,001$), у нирках – на 69 % ($p < 0,01$).

4. Попередник синтезу оксиду азоту L-аргінін при його введенні з 15 по 28 добу розвитку STZ-діабету сприяє зниженню рівня гіперглікемії на 14 % ($p < 0,01$), вмісту у печінці й нирках гідропероксидів ліпідів – на 16 % ($p < 0,001$) і 9 % ($p < 0,02$) та ТБК-активних продуктів – на 22 % ($p < 0,001$) і 12 % ($p < 0,001$) відповідно, покращанню стану антиоксидантної системи, зростанню активності сукцинатдегідрогенази, що відбувається на тлі збільшення вмісту NO_2^- у печінці та нирках й відновлення до рівнів контролю активності АлАТ, АсАТ, лужної фосфатази, вмісту сечовини та креатиніну у сироватці крові.

5. Блокатор NO-синтази неселективної дії N-нітро-L-аргінін при його введенні з 15 по 28 добу розвитку STZ-діабету поглиблює дефіцит NO_2^- у печінці та нирках, викликає подальше прогресування порушень у системі прооксиданти-антиоксиданти у крові й досліджуваних органах та погіршення структурних ознак ураження, що проявляється у печінці – гострими або підгострими токсикодистрофічними процесами, з частковим некрозом паренхіми різного ступеня, вогнищевим розростанням сполучної тканини, у нирках – генералізованим пошкодженням мікроциркуляторного русла, частковим зникненням нормального клубочкового та каналцевого малюнків.

6. Ступінь негативного впливу інгібітора індукбельної NO-синтази аміногуанідину при його введенні з 15 по 28 добу експерименту на стан внутрішніх органів при STZ-діабеті, порівняно з N-нітро-L-аргініном, є меншим, проте він викликає зниження вмісту NO_2^- у печінці – на 25 % ($p < 0,01$), у нирках – на 29 % ($p < 0,001$), не відновлює порушення у системах прооксиданти-антиоксиданти та мітохондріального транспорту електронів, що відбувається на тлі збереження структурних ознак ураження: у печінці – дистрофічних змін паренхіми, клітинної інфільтрації портальних трактів та гострих розладів кровообігу, у нирках – дифузних дистрофічних змін епітелію каналців, явищ ексудації клубочків. При застосуванні аміногуанідину з 2 по 28 добу експерименту показники ураження печінки та нирок суттєво не відрізняються від таких у тварин з STZ-діабетом без корекції. Аміногуанідин знижує рівні гіперглікемії та глікозильованого гемоглобіну відповідно на 32 % ($p < 0,001$) і 29 % ($p < 0,01$) – при його введенні протягом 2 тижнів, та на 16 % ($p < 0,001$) і 15 % ($p < 0,05$) – при введенні протягом 4 тижнів експерименту.

7. У гепато- та нефрозахисній дії L-аргініну та L-аргініну-L-глутамату при стрептозотоциновому діабеті позитивну роль відіграє їх здатність підвищувати рівень синтезу оксиду азоту, що підтверджується погіршенням стану цих органів при введенні блокаторів NO-синтази (аміногуанідину і, особливо, N-нітро-L-аргініну) та нівелюванням нормалізуючого впливу L-аргініну-L-глутамату на більшість показників ураження печінки та нирок при його поєднанні з аміногуанідином, що супроводжується зменшенням вмісту NO_2^- в органах відповідно на 78 % ($p < 0,001$) та 100 % ($p < 0,001$).

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Експериментальне дослідження гепатопротекторних властивостей глутаргіну при патологічних станах різного генезу / К. А. Посохова, О. М. Олешук, В. В. Ніколаєва, О. В. Гриців, І. М. Кліщ, О. О. Казанська, Л. Й. Плосканич, Т. А. Лебедева // Медицина сьогодні і завтра. – 2005. – № 1. – С. 15–20. (Здобувачем самостійно виконано пошук і аналіз літературних джерел, експериментальні дослідження, статистичну обробку отриманих результатів, пов'язаних з корекцією ураження печінки за допомогою глутаргіну на тлі стрептозотоцинового діабету).

2. Чернухіна О. О. Фармакологічна корекція системи L-аргінін-оксид азоту і стан печінки при цукровому діабеті / О. О. Чернухіна // Мед. хімія. – 2007. – Т. 9, № 4. – С. 47–50.

3. Чернухіна О. О. Роль системи оксиду азоту у патогенезі ураження нирок при цукровому діабеті / О. О. Чернухіна // Здобутки клініч. і експерим. медицини. – 2008. – № 2 (9). – С. 97–100.

4. Чернухіна О. О. Морфологічні зміни у печінці при експериментальному діабеті та призначенні попередників та блокаторів оксиду азоту / О. О. Чернухіна, К. А. Посохова, Т. В. Дацко // Вісник морфології. – 2009. – № 15(1). – С. 18–21. (Здобувачем самостійно проведено літературний пошук, виконано дослідження, сформульовано найважливіші положення, підготовлено статтю до друку).

5. Чернухіна О. О. Морфологічні зміни у нирках при експериментальному цукровому діабеті та призначенні модуляторів системи L-аргінін-оксид азоту / О. О. Чернухіна, К. А. Посохова, Т. В. Дацко // Вісник морфології. – 2010. – № 16(3). – С. 509–512. (Здобувачем самостійно виконано пошук і аналіз літературних джерел, експериментальні дослідження, сформульовано найважливіші положення, підготовлено статтю до друку).

6. Швед М. І. Вплив глутаргіну та аміногуанідину при їх окремому та поєднаному застосуванні на стан печінки при експериментальному цукровому діабеті / М. І. Швед, О. О. Чернухіна // Вісник наукових досліджень. – 2010. – № 3(60). – С. 94–96. (Здобувачем самостійно виконано пошук і аналіз літературних джерел, експериментальні дослідження, статистичну обробку результатів, сформульовано найважливіші положення, підготовлено статтю до друку).

7. Швед М. І. Вплив попередника та блокатора синтезу оксиду азоту при їх окремому та

поєднаному застосуванні на стан нирок при експериментальному цукровому діабеті / М. І. Швед, О. О. Чернухіна, К. А. Посохова // Клінічна та експериментальна патологія. – 2010. – Т. IV, № 3 (33). – С. 117–120. (Здобувачем самостійно виконано пошук і аналіз літературних джерел, експериментальні дослідження, проаналізовано результати, підготовлено матеріал до друку).

8. Казанська О. О. Вплив деяких модуляторів синтезу оксиду азоту на рівні глюкози, глікозильованого гемоглобіну та нітрит–аніону при експериментальному цукровому діабеті / О. О. Казанська, К. А. Посохова // Ювілейний VIII з'їзд ВУЛТ, Івано-Франківськ, 21–22 квітня 2005 р. : тези доп. – К., 2005. – С. 337. (Здобувачем самостійно виконано дослідження, статистично опрацьовано, проаналізовано і узагальнено отримані результати).

9. Посохова К. А. Зміни стану печінки під впливом глутаргіну при його призначенні у різні стадії розвитку цукрового діабету / К. А. Посохова, О. О. Чернухіна // Ліки та життя : Міжнародний медико-фармацевтичний конгрес, 21–24 лютого 2006 р. : тези доп. – К., 2006. – С. 107. (Здобувачем самостійно виконано дослідження, статистично опрацьовано і узагальнено результати).

10. Чернухіна О. О. Зміни стану нирок при стрептозотоциновому діабеті та при призначенні L-аргініну та глутаргіну / О. О. Чернухіна // X Міжнар. медичний конгрес студентів і молодих учених, 11–13 травня 2006 р. : матеріали конгр. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2006. – С. 239.

11. Результати застосування блокаторів синтезу оксиду азоту N-нітро-L-аргініну та аміногуанідину при деяких патологічних станах / К. А. Посохова, О. М. Олещук, Л. Й. Плосканич, Т. А. Лебедева, О. О. Чернухіна, В. В. Черняшова // Здобутки клінічної і експериментальної медицини : XLIX підс. наук.-практ. конф., 2 червня 2006 р. : матеріали конф. – Тернопіль : ТДМУ "Укрмедкнига", 2006. – С. 162–164. (Здобувачем самостійно виконано дослідження, пов'язані із застосуванням інгібіторів синтезу оксиду азоту при стрептозотоциновому діабеті, статистично опрацьовано отримані результати, підготовлено матеріал до друку).

12. Чернухіна О. О. Зміни стану нирок під впливом глутаргіну та аміногуанідину при експериментальному цукровому діабеті / О. О. Чернухіна, К. А. Посохова // Здобутки клінічної і експериментальної медицини : XLIX підс. наук.-практ. конф., 2 червня 2006 р. : матеріали конф. – Тернопіль : ТДМУ "Укрмедкнига", 2006. – С. 174–175. (Здобувачем самостійно виконано дослідження, статистично опрацьовано, проаналізовано, оформлено їх результати).

13. Посохова К. А. Структурно-функціональні зміни у печінці при експериментальному цукровому діабеті й призначенні попередників синтезу оксиду азоту та інгібіторів NO-синтази / К. А. Посохова, О. О. Чернухіна // Фармакологія 2006 – крок у майбутнє : III Національний з'їзд фармакологів України, 17–20 жовтня 2006 р. : тези доп. – Одеса, 2006. – С. 139. (Здобувачем самостійно виконано дослідження, статистично опрацьовано та проаналізовано їх результати, підготовлено матеріал до друку).

14. Чернухіна О. О. Вплив глутаргіну на структурно-функціональні зміни печінки при цукровому діабеті / О. О. Чернухіна // Здобутки та перспективи внутрішньої медицини : Всеукраїнська наук.-практ. конф., 19–20 жовтня 2006 р. : зб. наук. робіт. – Тернопіль : ТДМУ "Укрмедкнига", 2006. – С. 82–83.

15. Швед М. І. Морфофункціональна характеристика стану печінки при цукровому діабеті та призначенні модуляторів синтезу оксиду азоту / М. І. Швед, О. О. Чернухіна, К. А. Посохова // Здобутки клінічної і експериментальної медицини : підс. наук.-практ. конф., 8 червня 2007 р. : зб. матеріалів конф. – Тернопіль : ТДМУ "Укрмедкнига", 2007. – С. 59–60. (Здобувачем самостійно виконано дослідження, систематизовано і проаналізовано результати, підготовлено матеріал до друку).

16. Чернухіна О. О. Патогенез ураження внутрішніх органів при експериментальному цукровому діабеті / О. О. Чернухіна, К. А. Посохова // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2008. – № 2 (9). – С. 158–159. (Здобувачем самостійно виконано дослідження, статистичну обробку результатів, сформульовано найважливіші положення, підготовлено матеріал до друку).

17. Чернухіна О. Вплив N-нітро-L-аргініну на метаболічні процеси та структурні зміни у печінці та нирках при експериментальному цукровому діабеті / О. Чернухіна // XIII Міжнар. медичний конгрес студентів та молодих вчених, 27-29 квітня 2009 р.: матеріали конгр. – Тернопіль : Укрмедкнига, 2009. – С. 37.

18. Чернухіна О. О. Відповідність результатів біохімічних та гістологічних досліджень стану нирок при експериментальному цукровому діабеті та призначенні модуляторів синтезу оксиду азоту / О. О. Чернухіна // Сучасний стан та перспективи розвитку доказової медицини у вітчизняній охороні здоров'я : Всеукраїнська наук.-практ. конф., 28-29 травня 2009 р. : матеріали конф. – Тернопіль : ТДМУ "Укрмедкнига", 2009. – С. 68–69.

19. Чернухіна О. О. Морфологічні зміни у нирках при експериментальному цукровому діабеті та призначенні блокаторів NO-синтаз / О. О. Чернухіна, К. А. Посохова, Т. В. Дацко // Здобутки клінічної і експериментальної медицини : підс. наук.-практ. конф., 4 червня 2009 р. : зб. матеріалів конф. – Тернопіль : ТДМУ "Укрмедкнига", 2009. – С. 150. (Здобувачем самостійно виконано дослідження, сформульовано найважливіші положення, підготовлено матеріал до друку).

20. Швед М. І. Вплив глутаргіну та аміногуанідину при їх окремому та поєднаному застосуванні на патогенетичні ланки ураження печінки при цукровому діабеті / М. І. Швед, О. О. Чернухіна // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2009. – № 2 (11). – С. 151. (Здобувачем самостійно виконано дослідження, статистичну обробку отриманих результатів, сформульовано найважливіші положення, підготовлено матеріал до друку).

21. Чернухіна О. Особливості впливу попередника та блокатора синтезу оксиду азоту на стан нирок при їх окремому та поєднаному застосуванні при цукровому діабеті / О. Чернухіна // XIV

Міжнар. медичн. конгрес студентів та молодих вчених, 13-15 квітня 2010 р. : матер. конгр. – Тернопіль : Укрмедкнига, 2010. – С. 40.

22. Чернухіна О. О. Вплив глутаргіну та аміногуанідину при їх окремому та поєднаному застосуванні на стан печінки та нирок при стрептозотоциновому цукровому діабеті / О. О. Чернухіна // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2010. – № 2 (13). – С. 156–157.

АНОТАЦІЯ

Чернухіна О.О. Вплив попередників та блокаторів синтезу оксиду азоту на патогенетичні ланки ураження печінки та нирок при цукровому діабеті (експериментальне дослідження). – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія. – Державний вищий навчальний заклад „Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського” МОЗ України. Тернопіль, 2011.

Дисертація присвячена вивченню особливостей впливу попередників та блокаторів синтезу оксиду азоту на стан печінки та нирок при стрептозотоциновому цукровому діабеті.

У досліджах на білих нелінійних щурах-самцях встановлено, що експериментальний цукровий діабет (моделювали одноразовим інтраперитонеальним введенням стрептозотину, STZ, 50 мг/кг) супроводжується зростанням рівнів глюкози та глікозильованого гемоглобіну, активності аланін- і аспартатамінотрансферази, вмісту сечовини, креатиніну у сироватці крові, у тканині печінки та нирок – активацією процесів пероксидного окиснення ліпідів, компенсаторним підвищенням активності каталази та супероксиддисмути, зниженням рівня відновленого глутатіону, активності сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази мітохондрій, рівня стабільного метаболіту оксиду азоту (NO), гістологічними ознаками їх ураження. Прекурсори синтезу NO L-аргінін та L-аргініну-L-глутамат відновлюють пригнічене при діабеті утворення NO, що супроводжується зниженням рівнів глюкози, біохімічних маркерів гепато- та нефропатії у сироватці крові, зменшенням проявів оксидативного стресу у печінковій та нирковій тканині. L-аргініну-L-глутамат сприяє редукції гістологічних ознак ураження досліджуваних органів при цій патології. Блокатори NO-синтази N-нітро-L-аргінін та, меншою мірою, аміногуанідин, при діабеті спричиняють подальше прогресування у печінці та нирках процесів пероксидного окиснення ліпідів, біохімічних та гістологічних ознак їх ураження на тлі гальмування синтезу NO. Аміногуанідин дещо знижує рівні глюкози та глікозильованого гемоглобіну. Поєднане застосування L-аргініну-L-глутамату та аміногуанідину при стрептозотоциновому діабеті супроводжується погіршенням стану печінки та нирок, порівняно з групою тварин, яким вводили лише прекурсор синтезу NO, що підтверджує важливість активації утворення NO у реалізації гепато- та нефропротекторної дії L-аргініну-L-глутамату при цій патології.

Ключові слова: діабет, стрептозотозин, оксид азоту, печінка, нирки.

АННОТАЦІЯ

Чернухина Е.А. Влияние предшественников и блокаторов синтеза оксида азота на патогенетические звенья поражения печени и почек при сахарном диабете (экспериментальное исследование). – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.04 – патологическая физиология. – Государственное высшее учебное заведение „Тернопольский государственный медицинский университет имени И.Я. Горбачевского” МЗ Украины. Тернополь, 2011.

Диссертация посвящена исследованию особенностей влияния предшественников (L-аргинина и L-аргинина-L-глутамата) и блокаторов (N-нитро-L-аргинина и аминугуанидина) синтеза оксида азота на состояние печени и почек при стрептозотозиновом сахарном диабете.

В опытах на белых нелинейных крысах-самцах установлено, что сахарный диабет (Д) (моделировали однократным интраперитонеальным введением стрептозотозина, STZ, 50 мг/кг) сопровождается гибелью 20 % экспериментальных животных, уменьшением прироста массы их тела, возрастанием уровней глюкозы и гликозилированного гемоглобина, маркеров поражения печени и почек (активности АлАТ, АсАТ, щелочной фосфатазы, содержания креатинина, мочевины) в крови, активацией процессов перекисного окисления липидов, компенсаторным повышением активности супероксиддисмутазы и каталазы, снижением уровня восстановленного глутатиона, активности сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы митохондрий, угнетением синтеза оксида азота в ткани исследуемых органов, гистологическими признаками их поражения (в печени – дистрофически-некротическими изменениями центрлобулярных гепатоцитов, диффузной интерстициальной лимфогистиоцитарной инфильтрацией, в почках – явлениями фокальной гиалиново-капельной и вакуольной дистрофии с некрозом отдельных клеток в проксимальных отделах канальцев, субатрофией эпителиальных клеток в дистальных канальцах, отеком стромы коркового и мозгового вещества с явлениями лимфоидно-клеточной инфильтрации).

Прекурсоры синтеза NO L-аргінін и L-аргинина-L-глутамат предупреждают гибель животных при Д, способствуют нормализации прироста массы их тела в процессе эксперимента, восстанавливают угнетенное при Д образование NO, о чем свидетельствует возрастание содержания его стабильного метаболита NO_2^- в ткани исследуемых органов, что сопровождается снижением уровня гипергликемии, нормализацией биохимических маркеров поражения печени и почек в сыворотке крови (аланин- и аспартатаминотрансфераз, щелочной фосфатазы, мочевины, креатинина), уменьшением проявлений оксидативного стресса, восстановлением активности антиоксидантной системы, улучшением гистологической структуры исследуемых органов. При

введении животным с Д неселективного ингибитора NO-синтазы N-нитро-L-аргинина и блокатора индуцибельной изоформы фермента амингуанидина уровень их гибели составляет соответственно 40 % и 10 %. Использование N-нитро-L-аргинина и, в меньшей степени, амингуанидина при Д сопровождается дальнейшим повышением уровней биохимических показателей поражения органов в сыворотке крови, в ткани печени и почек – прогрессированием процессов перекисного окисления липидов и гистологических признаков гепатопатии и нефропатии, по сравнению с группой животных с Д без коррекции, что происходит на фоне торможения образования в органах NO_2^- . Амингуанидин способствует снижению уровней гипергликемии и гликозилированного гемоглобина в крови при Д. Комбинированное применение L-аргинина-L-глутамата и амингуанидина при гепатопатии и нефропатии, которые развиваются на фоне Д, приводит к ухудшению состояния печени и почек, по сравнению с группой животных, которым вводили только L-аргинина-L-глутамат, что проявляется уменьшением его положительного влияния на биохимические показатели, характеризующие состояние систем прооксиданты-антиоксиданты и митохондриального транспорта электронов в исследуемых органах. Комбинирование препаратов приводило также к нивелированию стимулирующего влияния L-аргинина-L-глутамата на образование NO с уменьшением содержания его стабильного метаболита NO_2^- в ткани органов. Полученные результаты подтверждают, что в механизмах гепато- и нефропротекторной активности L-аргинина-L-глутамата при стрептозотоциновом диабете, кроме антиоксидантного действия, важную роль играет его способность стимулировать синтез оксида азота.

Ключевые слова: диабет, стрептозотоцин, оксид азота, печень, почки.

SUMMARY

Chernuhina O.O. Influence of precursors and blockers of nitric oxide synthesis on pathogenesis of liver and kidney damage in diabetes mellitus (experimental investigation). – Manuscript.

Dissertation for obtaining a scientific degree of the candidate of medical sciences in speciality 14.03.04 – Pathological physiology. State Higher Educational Establishment „I.Ya. Horbachevsky Ternopil State Medical University” MPH of Ukraine. Ternopil, 2011.

Dissertation is dedicated to the studying of peculiarities of liver and kidney status under the influence of precursors and blockers of nitric oxide synthesis in streptozotocine diabetes mellitus.

It was shown in experiments on male albino rats that diabetes mellitus (single intraperitoneal injection of streptozotocine, 50 mg/kg) is accompanied with the increase of glucose and glycated hemoglobin levels, markers of liver and kidney lesion (amino transferases and alkaline phosphatase activities, creatinine and urea) in blood, activation of lipid peroxidation, activities of superoxide dismutase and catalase, the decrease of glutathione level, mitochondrial succinate dehydrogenase and

cytochrome oxidase activities, oppressing of nitric oxide synthesis in liver and kidneys, pathological changes of histological structure of the organs. NO precursors L-arginine and L-arginine-L-glutamate renew NO synthesis with concomitant decrease of hyperglycemia, biochemical changes in blood and signs of oxidative stress in liver and kidney tissue, restoration of antioxidant activity in diabetic rats. L-arginine-L-glutamate can also attenuate morphological signs of liver and kidney damage. Inhibitors of NO synthesis N-nitro-L-arginine, more so aminoguanidine, contribute to the acceleration of the biochemical and histological changes in diabetes. Aminoguanidine can partially decrease the levels of hyperglycemia and glycated hemoglobin in blood. Combined administration of L-arginine-L-glutamate and aminoguanidine for hepato- and nephropathy in diabetes mellitus is less beneficial as compared with single administration of L-arginine-L-glutamate. The fact confirms the importance of proper NO synthesis in realization of hepato- and nephroprotective activity of L-arginine-L-glutamate in diabetes.

Key words: diabetes, streptozotocine, nitric oxide, liver, kidney.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АЛАТ	–	аланінамінотрансфераза
АСАТ	–	аспартатамінотрансфераза
ГПЛ	–	гідропероксили ліпідів
Д	–	діабет
ЛФ	–	лужна фосфатаза
ПОЛ	–	пероксидне окиснення ліпідів
СДГ	–	сукцинатдегідрогеназа
СОД	–	супероксиддисмутаза
ТБК	–	тіобарбітурова кислота
ТБП	–	ТБК-активні продукти
ЦХО	–	цитохромоксидаза
AG	–	аміногуанідин
GSH	–	відновлений глутатіон
HbA1C	–	глікозильований гемоглобін
NNLA	–	N-нітро-L-аргінін
NO	–	оксид азоту
NO ₂ ⁻	–	нітрит-аніон
NOS	–	NO-синтаза
STZ	–	стрептозоточин
STZ-Д	–	стрептозоточинний діабет