

Вплив актовегіну на механізми розвитку окисного стресу у хворих на цукровий діабет 2-го типу з кардіоваскулярною автономною нейропатією

Я.А. Саєнко¹, О.О. Гончар², І.М. Маньковська², Т.І. Древицька², Л.В. Братусь²,
Б.М. Маньковський^{1,3}

¹ДУ «Науково-практичний медичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії МОЗ України», Київ;

²Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ;

³Національний університет охорони здоров'я України ім. П. Л. Шупика, Київ;
e-mail:olga.gonchar@i.ua

Було встановлено доцільність використання препарату актовегін для корекції змін про- та антиоксидантного балансу та експресії генів HIF-1 α (від англ. hypoxia-inducible factor 1- α) і mTOR (від англ. the mammalian target of rapamycin), що впливають на розвиток окисного стресу (ОС), у крові хворих на цукровий діабет 2-го типу (ЦД2) з кардіоваскулярною автономною нейропатією (КВАН). Показано, що внутрішньовенне введення актовегіну хворим у дозі 1000 мг на добу протягом 10 днів з подальшим пролонгованим пероральним вживанням по 800 мг на день впродовж 90 днів призводило до зниження вмісту вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів і генерації гідроперекису водню в крові, що свідчить про гальмування розвитку ОС у цих хворих. Це відбувалося на тлі значного підвищення активності супероксиддисмутази в плазмі і відновлення глутатіонового пулу в еритроцитах хворих на ЦД2 з КВАН. Генетичні дослідження показали, що лікування актовегіном призводило до значного збільшення експресії гена HIF-1 α та зниження експресії гена mTOR у лейкоцитах хворих, що імовірно може слугувати протективним механізмом, котрий протидіє ОС через різні сигнальні метаболічні шляхи. Таким чином, застосування актовегіну, який гальмує розвиток ОС через вплив на різні компоненти про- та антиоксидантної системи та експресію генів HIF-1 α і mTOR, може бути вагомим доповненням фармакологічної терапії пацієнтів з ЦД2 і КВАН. Ключові слова: актовегін; окисний стрес; HIF-1 α ; mTOR; цукровий діабет 2-го типу; кардіоваскулярна автономна нейропатія.

ВСТУП

Одним із поширених і тяжких ускладнень цукрового діабету (ЦД) є порушення автономної (вегетативної) іннервації різних органів, зокрема, розвиток кардіоваскулярної автономної нейропатії (КВАН) [1, 2]. Остання може проявлятися у різноманітних клінічних формах і супроводжуватися значним зростанням смертності хворих [2, 3]. Особливе значення КВАН як фактора розвитку серцево-судинних порушень має у пацієнтів старшого віку з ЦД 2-го типу (ЦД2), в яких ці порушення є причиною летальних випадків (65–75%). Патогенетичні механізми КВАН наразі не є

повністю з'ясованими. Вважається, що довготривала гіперглікемія при ЦД2 може чинити нейротоксичний вплив і здатна викликати пошкодження нейронів симпатичного та парасимпатичного відділів автономної нервової системи з порушенням синаптичної передачі і синаптичної пластичності через розвиток ОС [4–6]. Останній, як відомо, віддзеркалює дисбаланс між генерацією біологічно важливих активних форм кисню (АФК) та діяльністю системи антиоксидантного захисту (АОЗ), що і призводить до окисного пошкодження клітинних протеїнів, ліпідів і ДНК. Наразі є багато експериментальних і клінічних свідчень щодо ролі ОС у патогенезі ЦД2

© Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, 2023

© Видавець ВД “Академперіодика” НАН України, 2023

[7–9]. Стосовно КВАН, аналогічних даних у літературі значно менше [10, 11]. Якщо факт зростання продукції АФК у крові і тканинах зафіксований майже в усіх експериментальних і клінічних дослідженнях при ЦД2, то у сучасній літературі є дані як про активацію САОЗ у відповідь на підвищений рівень утворення вільних радикалів [12], так і про можливість виснаження адаптивної здатності САОЗ [13–15].

Разом з антирадикальними ферментами система глутатіону є однією із активних складових САОЗ, яка відіграє велику роль у послабленні ОС, особливо в еритроцитах, оскільки забезпечує ефективну елімінацію кінцевих метаболітів ПОЛ [16]. Дослідження глутатіонової системи у крові хворих на ЦД2 також демонструють суперечливі дані [17, 18]. Це відноситься також і до результатів дослідження САОЗ у крові хворих на ЦД2 з КВАН [10, 11]. Слід підкреслити, що досі не проводили цільового порівнювання факторів про- та антиоксидантного балансу в крові хворих на ЦД2 з КВАН і без неї.

Нещодавно було показано, що гетеродимерний транскрипційний протеїновий комплекс гіпоксііндуцибельний фактор (HIF), який складається з киснерегульованих α -субодиниць (HIF-1 α , HIF-2 α або HIF-3 α) та кисненезалежної β -субодиниці, відіграє критичну роль у регуляції продукції вільних радикалів кисню у клітинах завдяки різним механізмам: прямим – регуляція біосинтезу та аутофагії мітохондрій, перебудова патерну експресії субодиниць цитохром с-оксидази, а також опосередкованим – регуляція експресії піруватдегідрогенази-кінази-1 (ПДК-1), яка фосфорилує та інактивує пролілгідроксилази [19, 20]. Але у хворих на ЦД2 з КВАН дослідження експресії гена HIF-1 α у зв'язку з мінімізацією наслідків розвитку ОС досі не проводили.

Ще одним перспективним напрямком у цьому відношенні є дослідження при ЦД регуляторного білка mTOR. Останній є серин/треонінпротеїнкіназою, що входить критич-

ним компонентом до багатьох сигнальних шляхів та впливає на розвиток ОС при запаленні, ЦД2 і хворобі Альцгеймера [21–23]. Водночас немає даних щодо експресії гена mTOR у крові хворих на ЦД2 і КВАН.

Фармакотерапія діабетичної нейропатії, яка базується на принципах доказової медицини, являє собою велику галузь сучасної фармакології та біотехнології. В останні роки значну увагу привертає застосування препарату актовегін для лікування неврологічних і серцево-судинних ускладнень ЦД. Актовегін – лікарський препарат, який є депротейнізованим гемодіалізатом, отриманим методом ультрафільтрації із крові телят. Дані доклінічних досліджень показали, що він має специфічні фармакологічні ефекти, а саме – збільшує життєздатність і кількість нейронів (в культурі), кількість синаптичних зв'язків, нормалізує провідність і щільність нервових волокон, з одного боку, а з іншого – мінімізує негативний вплив АФК на нейрони [24]. Клінічні дослідження довели, що застосування актовегіну в комплексній або монотерапії хворих на ЦД2 і полінейропатію зменшувало інтенсивність ОС і поліпшувало стан системи мікроциркуляції разом із регресом негативної неврологічної симптоматики [25]. Розгорнутого дослідження впливу актовегіну на інтенсивність ОС і стан різних компонентів САОЗ, а також на експресію генів HIF-1 α і mTOR у хворих на ЦД2 з КВАН не проводили.

Мета нашого дослідження – встановити доцільність використання препарату актовегін для корекції змін про- та антиоксидантного балансу, що впливають на розвиток ОС, та експресії генів HIF-1 α і mTOR у крові хворих на ЦД2 з кардіоваскулярною автономною нейропатією.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено у ДУ «Науково-практичний медичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії МОЗ України» відповідно до законів України та принципів Гельсінської

Декларації з прав людини. Програма обстеження, інформація для пацієнта та форма інформованої згоди були погоджені комісією з питань етики цієї установи (протокол № 0025/615-21.05.2020 від 05.20). Умовою включення в дослідження була підписана інформована згода до початку обстеження.

Обстежено 10 хворих на Т2ЦД з КВАН віком $59,0 \pm 3,34$ років і тривалістю перебігу захворювання $12,45 \pm 1,82$ років. Контрольна група включала 10 практично здорових осіб віком $50,0 \pm 2,73$ років. Між цими групами не було розбіжностей за статевим розподілом (жінки – 60%, чоловіки – 40%) та індексом маси тіла (менш ніж 40 кг/м^2). Пацієнти з Т2ЦД і КВАН демонстрували більш атерогенний ліпідний профіль, ніж здорові учасники, і мали помірну артеріальну гіпертензію. Вміст глікованого гемоглобіну (HbA1c) у хворих сягав $8,8 \pm 0,84$ щодо $5,5 \pm 0,62\%$ у здорових ($P < 0,05$). Всі хворі приймали пероральні цукрознижувальні препарати – метформін, похідні сульфонілсечовини, інгібітори натрійзалежного котранспортера глюкози-2 (НЗКТГ-2); 5 пацієнтів отримували базисну інсулінотерапію. Крім того, всі хворі знаходилися на антигіпертензивній терапії (блокатори ренін-ангіотензинової системи, діуретики, антагоністи кальцію), а також перорально приймали статини. Хворим на тлі базисної терапії був проведений курс лікування препаратом актовегін («Nycomed», Австрія). Вводили його внутрішньовенно крапельно у дозі 1000 мг на добу протягом 10 днів з подальшим пролонгованим пероральним вживанням по 800 мг на день впродовж 90 днів.

Кров забирали з ліктьової вени натще і центрифугували при 3000g (4°C , 10 хв) для розділення плазми та еритроцитів. Далі гемолізовані еритроцити центрифугували при 5000g (4°C , 10 хв), в супернатанті визначали вміст гемоглобіну за допомогою реактивів Hemoglobin Assay Kit МАК 115 («Sigma-Aldrich», США). Всі реактиви для подальших біохімічних досліджень вироблені цією

самою фірмою. Біомаркером ОС у плазмі був вміст вторинних активних продуктів ПОЛ, які реагують з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК-АП) [26]. В еритроцитах визначали вміст H_2O_2 , який розраховували в мікромолях H_2O_2 на 1 мг гемоглобіну [27]. Активність сумарної супероксиддисмутази (СОД : КФ 1.15.1.1) вимірювали в плазмі за методом, який базується на інгібуванні цим ферментом аутооксидації адреналіну до адренохому [28]. Активність каталази (КФ 1.11.1.6) визначали у плазмі за методом, який базується на декомпозиції H_2O_2 , що призводить до зменшення екстинкції при довжині хвилі 240 нм [29]. Складові глутатіонової антиоксидантної системи вивчали в еритроцитах. Активність селензалежної глутатіонпероксидази (ГП: КФ 1.11.1.9) визначали спектрофотометрично реєстрацією швидкості окиснення НАДФН за наявності відновленого глутатіону (GSH), пероксиду водню та надлишку глутатіонредуктази (2,4 ум.од./мл) при довжині хвилі 340 нм [30]. Вміст GSH вимірювали також спектрофотометрично в реактивній суміші при довжині хвилі 412 нм (коефіцієнт молярного поглинання $13\ 600\ \text{л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$) [31].

Експресію генів HIF-1 α і mTOR визначали в лейкоцитах, які одержували за допомогою подвійного центрифугування цільної крові за стандартною методикою [32]. Тотальну РНК ізолювали з фракції лейкоцитів за допомогою тризол-реагента («Invitrogen», США) і використовували для одержання single-stranded DNA за допомогою реактивів Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit («Thermo Scientific™», США). Ця ДНК далі була задіяна для оцінки кількісних змін експресії генів із застосуванням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі, яку проводили на термоциклері “7500 Fast Real-Time PCR System” («Applied Biosystems», США). Результати визначення вмісту мРНК HIF-1 α і mTOR нормалізували за експресією конститутивного референтного гена β -актин, використовуючи реактиви Taq Man Human β -actin Control Reagent («Invitrogen», США).

Рівень відносної експресії досліджуваних генів був розрахований з використанням порівнювального C_t -методу та нормалізований за експресією референтного гена ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

Результати оброблено загальноприйнятими методами варіаційної статистики за програмою “Origin 7,0”. Вірогідність розходжень між групами порівняння була визначена методом дисперсійного аналізу (ANOVA) з наступним тестом Бонферроні (post-hoc test). Результати представлено у вигляді Mean \pm SD і вважали вірогідними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У нашому дослідженні у пацієнтів з ЦД2 і КВАН значно підвищувався вміст вторинних продуктів ПОЛ ТБК-АП у плазмі та продукція H_2O_2 в еритроцитах (на 61 і 41% відповідно) порівняно з контролем ($P < 0,05$) (табл. 1; 2).

Нестабільні ліпідні сполучення (перокси-ди), які виникають при розпаді поліненасичених жирних кислот на такі компоненти, як ізопростани, алконали тощо, можуть впливати на розвиток кардіоваскулярних

ускладнень при ЦД2, реалізуючи патогенну дію гіперпродукції АФК [33]. Нині встановлено інтрацелюлярні метаболічні механізми, які сприяють збільшенню продукції АФК при ЦД2: це викликана гіперглікемією активація поліолового і гексозамінового шляхів метаболізму глюкози, а також протейнінази С, надмірна генерація кінцевих продуктів розвиненого глікозилювання, високий вміст вільних жирних кислот тощо [9]. Відносно генезу гіперпродукції АФК у нейронах автономної нервової системи при ЦД2 відомо, що довготривале зростання вмісту глюкози в нейронах викликає мітохондріальну дисфункцію зі збільшенням концентрації донорів електронів у електронно-транспортному ланцюгу мітохондрій, через що останній блокується в комплексі III із генерацією АФК [4]. Не можна виключати і роль інших джерел (мікосомальних монооксидаз, NO-синтази та ін.) у продукції супероксидного аніон-радикала в нейронах за умов гіперглікемії. Високий вміст АФК інактивує нікотинові ацетилхолінові рецептори (nAHP) у нейронах вегетативних гангліїв і постгангліонарних

Таблиця 1. Вміст вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів, активність ферментів супероксиддисмутази та каталази у плазмі крові хворих на цукровий діабет 2-го типу (ЦД2) з кардіоваскулярною автономною нейропатією(КВАН) до та після введення актовегіну (M \pm m, n= 10)

Схема досліджу	ТБК-активні продукти мкмоль/мл	Супероксиддисмутаза ум.од./мл	Каталаза мкмоль \cdot хв ⁻¹ \cdot мл ⁻¹
Контроль	5,12 \pm 0,89	12,83 \pm 1,53	3,49 \pm 0,66
ЦД2 і КВАН	8,23 \pm 1,13*	15,46 \pm 2,25*	6,48 \pm 1,92*
ЦД2, КВАН і актовегін	6,59 \pm 1,03*,**	20,53 \pm 3,81*,**	5,08 \pm 1,86

Примітка: тут і в табл. 2 * $P < 0,05$ порівняно з контролем; ** $P < 0,05$ порівняно зі значеннями при ЦД2 і КВАН.

Таблиця 2. Вміст перекису водню, відновленого глутатіону (GSH), активність глутатіонпероксидази (ГП) у еритроцитах крові хворих на цукровий діабет 2-го типу з кардіоваскулярною автономною нейропатією (КВАН) до та після введення актовегіну (M \pm m, n = 10)

Схема досліджу	H_2O_2 мкмоль/мг гемоглобіну	GSH мкмоль/мг гемоглобіну	ГП нмоль НАДФН:хв ⁻¹ мг гемоглобіну ⁻¹
Контроль	9,76 \pm 0,80	11,57 \pm 1,48	10,39 \pm 1,64
ЦД2 і КВАН	13,72 \pm 1,82*	7,92 \pm 1,00*	8,38 \pm 1,96*
ЦД2, КВАН і актовегін	11,46 \pm 1,60*,**	8,90 \pm 1,19*	8,84 \pm 1,71

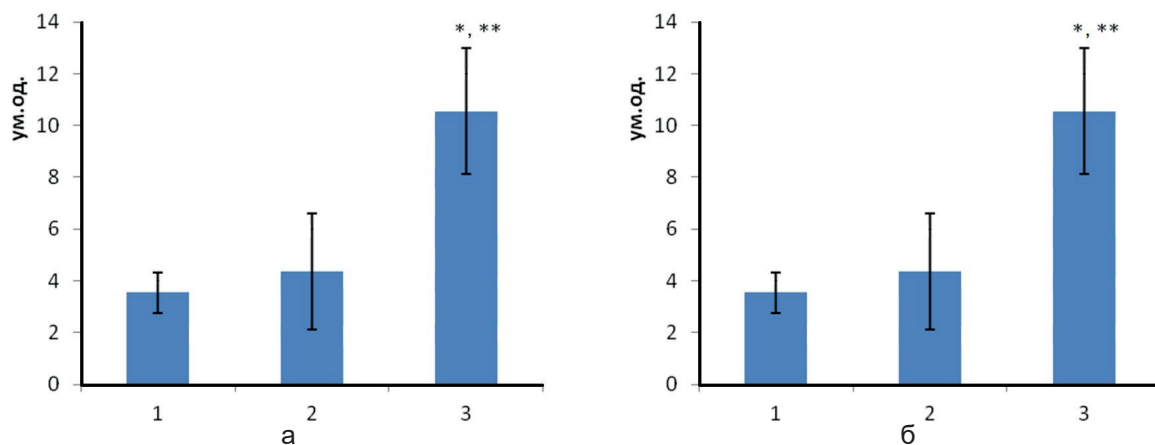
аксонів з порушенням іннервації кардіоваскулярної системи і розвитком КВАН [6].

Можна припустити, що встановлене нами підвищення активності сумарної СОД і каталази на 21 і 86% відповідно в крові хворих на ЦД2 і КВАН порівняно з контрольними значеннями (див. табл. 1, $P < 0,05$) має компенсаторний характер і розвивається у відповідь на надмірне утворення АФК – супероксид-аніона, який є субстратом для СОД, та гідроперекису водню, який є субстратом для каталази. Ці ензими визначаються як первинна ланка антирадикального клітинного захисту, що протидіє окисненню клітинних макромолекул ще на стадії ініціювання [34]. Крім того, ми встановили зниження в еритроцитах хворих вмісту GSH (на 31%, $P < 0,05$) та активності ГП (на 19%, $P < 0,05$) порівняно з контролем (див. табл. 2). Подібні дані були наведені у праці Mendez і співавт. [18] стосовно змін глутатионової системи у хворих на ЦД2 з дистальною симетричною периферичною полінейропатією. Відомо, що ефективне виконання системою глутатіону таких функцій, як антирадикальний захист і підтримка тіол-дисульфідної рівноваги, забезпечується завдяки достатньому вмісту GSH у клітинах. Він підтримується двома шляхами: синтезом GSH *de novo* і відновленням окисненого глутатіону (GSSG) в глутатіонредуктазній реакції з використанням НАДФН. При ЦД2 гіперглікемія індукує активацію поліолового шляху окиснення глюкози з вичерпанням запасів НАДФН і підсиленням аутооксидативної глюкози, що сприяє швидкому утворенню АФК зі збільшенням вмісту GSSG і зменшенням GSH в еритроцитах [17]. Виснаження глутатионового пулу в еритроцитах хворих на ЦД2 з КВАН вказує на значне порушення інтрацелюлярного редокс-балансу із інтенсифікацією прооксидантних процесів.

Генетичні дослідження виявили відсутність істотного збільшення відносної експресії гена HIF-1 α у лейкоцитарній фракції крові хворих із ЦД2 і КВАН порівняно з контролем (рисунок, а). Оскільки відомо, що більшість

тканин при ЦД2 знаходяться у гіпоксичному стані, цей результат вказує на порушення адаптивної відповіді на гіпоксію, що пов'язано з дисрегуляцією HIF-1 α -сигналізації [35]. Механізмами такої дисрегуляції, головним чином, є гіперглікемія та високий вміст жирних кислот (пальмітинової чи олеїнової), які пришвидшують пролілгідроксилазну деградацію HIF-1 α [20]. Показано, що порушення HIF-1 α -сигналізації, збільшуючи інтенсивність ОС, було причиною незадовільного загоєння ран [36], а відсутність гена, який кодує білок HIF-1 α в ембріональних фібробластах миші, була відповідальною за загибель клітин внаслідок гіперпродукції АФК [37]. Недавні клінічні дослідження показали, що експресія гена HIF-1 α корелює зі ступенем метаболічного контролю при ЦД2 [38]. Отже, відсутність адекватного зростання експресії гена HIF-1 α в лейкоцитах хворих на ЦД2 і КВАН може вказувати на домінування прооксидантних процесів та можливість значного оксидативного клітинного пошкодження.

Ми виявили також значне зниження (на 48%, $P < 0,05$) експресії гена mTOR у лейкоцитах хворих на ЦД2 і КВАН порівняно з контролем (див. рисунок, б). Значення змін експресії гена і білка mTOR при ЦД важко переоцінити. Відомо, що mTOR взаємопов'язаний з сигнальними шляхами, які регулюють клітинний метаболізм, життєздатність стовбурових клітин, секрецію інсуліну та інсулінорезистентність, апоптоз та аутофагію тощо. Ці механізми його дії не є предметом розгляду в нашій роботі. Що стосується розвитку ОС, то встановлене зниження експресії гена mTOR в крові хворих на ЦД2 і КВАН, безумовно, має компенсаторне значення, оскільки воно може сприяти індукції аутофагії та апоптозу, які протидіють оксидативній ліпопротеїдній низької щільності, що призводить до «спалаху» ОС у нейронах та капілярних перичитах у цих хворих [23]. Більше того, зростання активності АМР-активованої протеїнкінази (АМРК), що



Відносний рівень експресії генів mRNA HIF-1α/β-актин (а) та mRNA mTOR/β-актин (б) у лейкоцитах крові: 1 – здорові особи (контроль); 2 – хворі на цукровий діабет 2-го типу (ЦД2) з кардіоваскулярною автономною нейропатією (КВАН); 3 – хворі на ЦД2 і КВАН після введення актовегіну ($M \pm m$, $n = 10$). * $P < 0,05$ порівняно з контролем; ** $P < 0,05$ порівняно з дією ЦД2 і КВАН

супроводжує інгібування mTOR, зменшувало інсулінорезистентність та вираженість ОС у тканинах завдяки активації аутофагії в експериментальних моделях ЦД2 [39].

Постає питання, чи встановлене зниження експресії гена mTOR являє собою адаптивну протективну реакцію, спрямовану на протидію розвитку ОС, що виникає під час тривалого перебігу ЦД2, чи воно може бути наслідком антидіабетичної терапії. Адже відомо, що метформін має виражений ефект протидії гіперпродукції АФК та помітно регулює активність білкового мультикомплексу mTORC1 [22].

Після курсу терапії препаратом актовегін у хворих на ЦД2 і КВАН знижувався вміст ТБК-АП у плазмі на 20% (див. табл. 1) і H_2O_2 в еритроцитах на 16% (табл. 2) порівняно з такими показниками у хворих до лікування ($P < 0,05$). Подібне зниження показників прооксидантної системи вказує на уповільнення розвитку ОС у цих хворих. Під впливом актовегіну підвищувалась активність сумарної СОД на 33% (див. табл. 1) порівняно зі значеннями до лікування ($P < 0,05$). При цьому активність каталази не зазнавала істотних змін. Можна дійти висновку, що антиоксидантні можливості актовегіну забезпечуються його високою СОД-активністю. Ми

вважаємо, що за механізмом антиоксидантної дії його можна порівняти з такими препаратами, як СОД-міметики, зокрема з темполом, нітроксидвивільнюючою сполукою. Цей агент (як і актовегін) не є специфічним для мітохондрій, оскільки протидіє сумарному клітинному супероксид-аніону [40]. Вживання темполу, зменшуючи інтенсивність ОС, мало позитивний ефект при діабетичній нефропатії [41].

Ми виявили вплив актовегіну на глутатионову антиоксидантну систему у хворих на ЦД2 з КВАН: вміст GSH та активність ГП в еритроцитах мали тенденцію до зростання порівняно з такими показниками до лікування (див. табл. 2). Наші результати свідчать про те, що актовегін протидіє виснаженню глутатионового пулу в еритроцитах і призводить до його поступового відновлення. Це може бути пов'язано із підвищенням синтезу білків та активності глутатіонзалежних і НАДФ⁺-генеруючих ферментів, зниженням їх чутливості до дії супероксид-аніона [16]. Таким чином, застосування актовегіну у хворих на ЦД2 з КВАН може призводити до зниження інтенсивності ОС у тканинах внаслідок посилення ендogenous антиоксидантного захисту. Вже згадувалося про роль інактивації nAHP у нейронах вегетативної нервової системи під

впливом АФК при ЦД2. На молекулярному рівні було показано, що порушення структури $\alpha 3$ -субодиниці НАХР у результаті окиснення АФК Суs-ділянки пов'язано з розладами тіол-дисульфідного балансу [42]. Ми можемо висловити припущення, що актовегін, підтримуючи внутрішньоклітинну тіол-дисульфідну рівновагу через активацію системи глутатіону, сприяє зниженню інтенсивності ОС як фактора розвитку депресії синаптичної нейропередачі та дисфункції автономної нервової системи за умов ЦД2 [6]. Виходячи із літературних даних, ми припускаємо також, що актовегін може позитивно впливати на синаптичну мускаринову холінопередачу та α -адренергічну передачу до нейронів вегетативних гангліїв, протидіючи зниженню концентрації міоінозиту та активності Na^+ - K^+ -АТФази за умов гіперглікемії при ЦД2 з КВАН [6]. Усі ці припущення потребують подальших конкретних доказів.

У нашій роботі було встановлено, що у хворих на ЦД2 і КВАН лікування актовегіном призводило до значного збільшення (у 2,43 раза) експресії гена HIF-1 α в лейкоцитах порівняно з таким показником до лікування ($P < 0,05$; див. рисунок, а). Цей результат дає змогу стверджувати, що актовегін підсилює адаптивну відповідь на тканинну гіпоксію через активацію різноманітних сигнальних шляхів транскрипційного фактора HIF-1 α , у тому числі тих, що знижують продукцію АФК у нейронах вегетативної нервової системи при ЦД2 і КВАН. Конкретні субклітинні та молекулярні механізми впливу актовегіну, ймовірно, мають відношення до змін осмолярності і протеасомної активності, які можуть деактивувати HIF-1 α , а також до зниження чутливості до «машинерії» VHL (від англ. Von Hippel-Lindau), до перебудов експресії субодиниць цитохром с-оксидази (з COX_{4-1} на COX_{4-2}), що забезпечують достатню продукцію АТФ зі зниженням генерації АФК тощо [43].

Застосування актовегіну викликало подальше зниження експресії гена mTOR у

лейкоцитах хворих на ЦД2 з КВАН порівняно з таким показником до лікування (на 40%, $P < 0,05$), а порівняно з контролем цей рівень знизився у 3,18 раза (див. рисунок, б). Отже, курс лікування препаратом актовегін призводив до потенціювання факторів зменшення експресії гена mTOR у хворих, що, в свою чергу, підсилювало інгібування ОС [23, 35]. Можна припустити, що актовегін діє через такі сигнальні шляхи, як AMPK і SIRT1, які є відомими інгібіторами mTOR. Крім того, метформін, котрий є агентом, що контролює гіперглікемію при ЦД, може активувати AMPK і блокувати активність mTOR. Діючи сумісно, AMPK і SIRT1, можуть бути клітинними протекторами через індукцію аутофагії та інгібування окисдації ліпопротеїдів низької щільності. Під час індукції аутофагії послаблюється інтенсивність ОС, що знижує розвиток кардіоміопатії і підвищує життєздатність кардіоміоцитів в експериментальних моделях ЦД [23]. У нейронах вегетативної нервової системи SIRT1 блокує mTOR-сигналізацію, що сприяє нейрональному росту за умов гіперглікемії [44]. Встановленим є і той факт, що mTORC1-сигналізація та ОС взаємопов'язані, тобто інгібування надмірної активності mTORC1 може одночасно зменшувати продукцію АФК [21]. Отже, модуляція активності mTOR буде корисною в лікуванні ЦД2 з КВАН, зменшуючи ОС, регулюючи метаболічний гомеостаз і підвищуючи механізми клітинного захисту. Наразі відомо, що рапаміцин, який є потужним інгібітором mTOR, показав свою ефективність при лікуванні ЦД та його ускладнень [21]. Цей препарат широко вживається клінічно як антиканцерогенний та імуномодулюючий агент. Водночас він має значні побічні ефекти, викликаючи порушення вуглеводного та ліпідного метаболізму [21]. Тому є необхідність розробки нових інгібіторів mTOR з більш вираженим впливом саме на неадекватну гіперактивацію mTORC1 та гіперпродукцію активних форм кисню.

ВИСНОВКИ

1. Застосування актовегіну призводить до зниження ПОЛ і продукції гідроперекису водню в крові хворих на Т2ЦД з КВАН, що свідчить про гальмування у них розвитку ОС.

2. Актовегін здатний значно підвищувати компенсаторну реакцію з боку антирадикального ферменту СОД, діючи як СОД-міметик, у хворих на ЦД2 з КВАН.

3. Лікування актовегіном може призводити до зниження інтенсивності ОС у крові хворих на ЦД2 з КВАН внаслідок підсилення ендogenous антиоксидантного захисту із залученням системи глутатіону.

4. Встановлене збільшення експресії гена HIF-1 α і зменшення експресії гена mTOR під впливом актовегіну може слугувати протективним механізмом, котрий протидіє ОС через різні сигнальні метаболічні шляхи.

5. Застосування актовегіну, який гальмує розвиток ОС через вплив на різні компоненти про- та антиоксидантної системи, може бути вагомим доповненням фармакологічної терапії хворих на ЦД2 і КВАН.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

Y.A. Saenko¹, O.O. Gonchar², I.M. Mankovska², T.I. Drevytska², L.V. Bratus², B. M. Mankovsky^{1,3}

THE EFFECT OF ACTOVEGYN ON THE MECHANISMS OF OXIDATIVE STRESS DEVELOPING IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS AND CARDIOVASCULAR AUTONOMIC NEUROPATHY

¹Government Institution The Scientific and Practical Medical Center of Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery of the Ministry of Health of Ukraine, Kyiv;

²O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

³Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv; e-mail: olga.gonchar@i.ua

The effects of actovegin on the mechanisms of oxidative stress (OS) developing in the blood of patients with type 2 diabetes

mellitus (DM2) and cardiovascular autonomic neuropathy (CVAN) were investigated. The aim of the study was to establish the effectiveness of treatment with actovegin for the pro- and antioxidant balance impairment and changes in gene expression of HIF-1 α and mTOR in the blood of patients with DM2 and CVAN. It was shown that intravenous injections of actovegin at a dose of 1000 mg per day for 10 days and further prolonged oral administration of this drug at a dose of 800 mg per day for 90 days led to a decrease in the content of secondary products of lipid peroxidation in blood plasma and H₂O₂ production in erythrocytes of patients with DM2 and CVAN. These changes were indicative of a weakening of OS intensity. It was also shown that treatment with actovegin promoted an increase in total plasma SOD activity as well as reduced glutathione and glutathione peroxidase activity in erythrocytes from patients. Treatment with actovegin also raised the gene expression of HIF-1 α and reduced the gene expression of mTOR in leukocytes of patients with DM2 and CVAN. These genetic changes may serve as a protective mechanism against the development of OS, which acts through different metabolic pathways. So, actovegin administration counteracting OS development due to the impact on the different components of pro- and antioxidant system as well as on HIF-1 α and mTOR genes expression may offer new clinical avenues for pharmacological treatment of patients with DM2 and CVAN. Key words: actovegin; oxidative stress; HIF-1 α ; mTOR; type 2 diabetes mellitus; cardiovascular autonomic neuropathy.

REFERENCES

1. Vinik AI, Maser RE, Ziegler D. Neuropathy: the crystal ball for cardiovascular disease? *Diabetes Care*. 2010;33(7):1688-90.
2. Mankovsky BM. Diabetic neuropathy: from top to toe. Kyiv: Vira Project. 2021 [Ukrainian].
3. Pop-Busui R, Evans GW, Gertein HC, et al. Action to control cardiovascular risk in diabetes study group. Effects of cardiac autonomic dysfunction on mortality risk in the action to control cardiovascular risk in diabetes (ACCORD) trial. *Diabetes Care*. 2010;33:1578-84.
4. Tomlinson DR, Gardiner NJ. Glucose neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9(1):36-45.
5. Alzoubi KH, Khabour OF, Alhaidar IA, Aleisa AM, Alkadhi KA. Diabetes impairs synaptic plasticity in the superior cervical ganglion: possible role for BDNF and oxidative stress. *J Mol Neurosci*. 2013;51(3):763-70.
6. Nastencko AO, Purnyn HE, Veselovsky NS. Physiological functions disorders of the superior cervical ganglion neurons in diabetes mellitus. *Fiziol Zh*. 2022; 68(1):74-86.
7. Piconi L, Quagliaro L, Ceriello A. Oxidative stress in diabetes. *Clin Chem Lab Med*. 2003; 41:1144-49.
8. Moussa SA. Oxidative stress in diabetes mellitus. *Roman J Biophys*. 2008;18:225-36.
9. Sivitz WI, Yorek MA. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2010;12:537-77.

10. Kayama Y, Raaz U, Jagger A, Matti A. Diabetic cardiovascular disease induced by oxidative stress. *Int J Mol Sci.* 2015; 16.10:25234-63.
11. Spallone V. Update on the impact, diagnosis and management of cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes: what is defined, what is new, and what is unmet. *Diabet Metab J.* 2019;43(1):3-30.
12. Bandeira SM, Guedes GS, Fonseca LJS, Pires AS, Gelain DP, Claudio J, Moreira F, Rabelo LA, Vasconcelos SML, Goulart MOF. Characterization of blood oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients: Increase in lipid peroxidation and SOD activity. *Oxid Med Cell Longev (Online).* 2012;819310.
13. Soliman GZA. Blood lipid peroxidation (superoxide dismutase, malondialdehyde, glutathione) levels in Egyptian type 2 diabetes patients. *Singapore J.* 2008;49:129136.
14. Tavares AM, Silva JH, Bensusan OCh, Ferreira ACF, de Lima Matos LP, et al. Altered superoxide dismutase-1 activity and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *PLoS ONE.* 2019;14(5): 216-56.
15. Mendoza-Núñez VM, García-Martínez BI, Rosado-Pérez J, Santiago-Osorio E, Pedraza-Chaverri J, Hernández-Abad VJ. The effect of 600 mg alpha-lipoic acid supplementation on oxidative stress, inflammation, and RAGE in older adults with type 2 diabetes mellitus. *Oxid Med Cell Long (Online).* 2019;3276958.
16. Dickinson D, Forman H. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol.* 2002;64:1019-26.
17. Kolesnichenko T, Bardimova E, Sergeeva M, Sergeeva N, Verlan N, Belouova I. Glutathione antioxidant system in patients with Diabetes Mellitus. *J Clin Lipidol.* 2008;2(5S):124-5.
18. Mendez MM, Folgado J, Tormo C, Artero A, Ascaso M, Martinez-Hervás S, et al. Altered glutathione system is associated with the presence of distal symmetric peripheral polyneuropathy in type 2 diabetic subjects. *J Diabet Complicat.* 2015;29:923-7.
19. Persson P, Palm F. Hypoxia-inducible factor activation in diabetic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hyperten.* 2017;26(5):345-50.
20. Catrina S-B, Zheng X. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in diabetes and its complications. *Diabetologia.* 2021;64:709-16.
21. Yasuda-Yamahara M, Kume S, Maegawa H. Roles of mTOR in diabetic kidney disease. *Antioxidants.* 2021;10:321-35.
22. Mao Z, Zhang W. Role of mTOR in glucose and lipid metabolism. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(7):2043-53.
23. Maiese K. Novel nervous and multi-system regenerative therapeutic strategies for diabetes mellitus with mTOR. *Neural Regen Res.* 2016; 11(3):372-85.
24. Elmlinger MW, Kriebel M, Ziegler D. Neuroprotective and anti-oxidative effects of the hemodialysate actovegin on primary rat neurons in vitro. *Neuromolec Med.* 2011;13(4):266-74.
25. Ziegler D, Edmundson S, Gurieva I, Mankovsky B, et al. Predictors of response to treatment with Actovegin for 6 months in patients with type 2 diabetes and symptomatic polyneuropathy. *J Diabet Complicat.* 2017;31(7):1181-7.
26. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.
27. Wolff SP. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods Enzymol.* 1994;233:182-9.
28. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972; 247(10):3170-5.
29. Aebi H. Catalase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, Ed: Bergmeyer, H.U. Weinheim and Academic Press. 1983:227-82.
30. Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984;105:114-21.
31. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Annal Biochem.* 1968;25(1): 192-205.
32. Mankovska IM, Rozova KV, Gonchar OO, Nosar VI, Bratus LV, Drevitska TI, Glazyrin ID, Karasevich NV, Karaban IM. The Influence of capicor on the Parkinson's disease pathogenetic links. *Fiziol Zh.* 2018;64(1):16-24.
33. Mezzetti A, Cipollone P, Cucurullo F. Oxidative stress and cardiovascular complications in diabetes: isoprostanes as a new markers on an old paradigm. *Cardiovascul Res.* 2000;47:475-88.
34. Buettner R. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anticancer Agents Med Chem.* 2011;11(4): 341-6.
35. Saenko Y A, Gonchar OO, Mankovska IM, Drevytska TI, Bratus LV, Mankovsky B. Oxydative stress in type 2 diabetic patients: involvement of HIF-1 alpha and mTOR genes expression. *Ukr Biochem J.* 2023; 95(2):47-56.
36. Botusan IR, Sunkari VG, Savu O, Catrina AI, Grünler J, Lindberg S, Pereira T, Ylä-Herttua S, Poellinger L, Brismar K, Catrina S-B. Stabilization of HIF-1alpha is critical to improve wound healing in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(49):19426-31.
37. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ.* 2008;15(4):621-7.
38. López-Cano C, Gutiérrez-Carrasquilla L, Barbé F, Sánchez E, Hernández M, Martí R, et al. Effect of type 2 diabetes mellitus on the hypoxia-inducible factor 1-alpha expression. Is there a relationship with the clock genes? *J Clin Med.* 2020;9:2632-42.
39. Kumawat M, Pahwa MB, Gahlaut VS, Singh N. Status of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus with micro vascular complications. *Open Endocrinol J.* 2009;3:12-5.
40. Thiernemann C. Membrane-permeable radical scavengers (tempol) for shock, ischemia-reperfusion injury, and inflammation. *Crit Care Med.* 2003;31:76-84.
41. Asaba K, Tojo A, Onozato ML, Goto A, Fujita T. Double-edged action of SOD mimetic in diabetic nephropathy. *J Cardiovascul Pharmacol.* 2007;49:13-9.

42. Campanucci V, Krishnaswamy A, Cooper E. Diabetes depresses synaptic transmission in sympathetic ganglia by inactivating nAChRs through a conserved intracellular cysteine residue. *Neuron*. 2010;66(6):827-34.
43. Gunton JE. Hypoxia-inducible factors and diabetes. *J Clin Invest*. 2020;130(10):5063-73.
44. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012;149:274-93.

*Матеріал надійшов
до редакції 30.06.2023*