

# Вплив препаратів метаболічної дії на розвиток окисного стресу у хворих на цукровий діабет 2-го типу

Я.А. Саєнко<sup>1</sup>, О.О. Гончар<sup>2</sup>, І.М. Маньковська<sup>2</sup>, Т.І. Древицька<sup>2</sup>, О.О. Клименко<sup>2</sup>, Б.М. Маньковський<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: olga.gonchar@i.ua

*Лікувальні засоби, які спрямовані на подолання дисбалансу між генерацією та утилізацією активних форм кисню (АФК), слугують важливим підходом до терапії цукрового діабету (ЦД) 2-го типу та його ускладнень. Метою роботи було дослідження впливу вітчизняних лікарських препаратів метаболічної дії на розвиток окисного стресу у хворих на ЦД 2-го типу. Показано, що комбіноване пероральне застосування препаратів армадину у дозі 300 мг за добу та тризипіну у дозі 500 мг за добу впродовж 60 днів призводило до гальмування впливу окисного стресу на його мішені – білки, ліпіди та ДНК – у крові хворих на ЦД 2-го типу. Про це свідчить зниження рівня окисної модифікації протеїнів і вмісту вторинних продуктів перекисно-окиснення ліпідів у плазмі крові та зміни експресії генів транскрипційного фактора HIF-1α і білка mTOR (ключових регуляторів продукції АФК) у лейкоцитах крові. Це відбувалося на тлі зниження генерації пероксиду водню в еритроцитах хворих та підвищення активності як антирадикального захисту, так і глутатіонової антиоксидантної системи в плазмі та еритроцитах після лікування. Генетичні дослідження показали, що застосування армадину сумісно з тризипіном значно збільшувало експресію гена HIF-1α та протидіяло зниженню експресії гена mTOR у лейкоцитах крові хворих на ЦД 2-го типу.*

*Ключові слова:* армадин; тризипін; окисний стрес; HIF-1α; mTOR; цукровий діабет 2-го типу.

## ВСТУП

Цукровий діабет 2-го типу (ЦД2) є багатофакторним метаболічним захворюванням, що супроводжується численними ускладненнями та являє собою одну з найважливіших медико-соціальних проблем [1]. Окисний стрес (ОС) вважається одним із провідних патогенетичних механізмів, який здатен підсилювати запальні та деструктивні процеси при ЦД2 та зумовлювати взаємообтяжувальний його перебіг та супутніх поліорганих ускладнень [2].

На молекулярному рівні пошкоджувальна дія активних форм кисню (АФК) спрямована на три типи мішеней – білки, ліпіди та ДНК. На тлі гіперглікемії активується велика кількість метаболічних механізмів, що сприяють надмірному утворенню АФК: внутрішньоклітинна акумуляція глікованих

протеїнів, окиснення як самих вуглеводів, так і їх комплексів із різноманітними білками, аутоокиснення жирних кислот у тригліцеридах, фосфоліпідах та ефірах холестерину, активація поліолового обміну глюкози та протеїнкінази С, порушення мітохондріального окиснення, обміну простагландинів і лейкотрієнів, зниження активності гліоксалаз; крім того ішемія та тканинна гіпоксія, які спостерігаються за умов ЦД2, є додатковими факторами, котрі відповідають за надмірне утворення реактивних оксидантів у різних тканинах [1, 3].

Впливу АФК протидіє система антиоксидантного захисту (САОЗ), яка представлена в організмі декількома рівнями і включає ферментативні та неферментативні складові. Ключовими ланками катаболізму АФК вважаються ферменти супероксиддисмутази

(СОД), каталаза та глутатіонпероксидаза, а також система глутатіону. Виснаження антиоксидантних систем належить до ознак кумулятивного окисного стресу, який сприяє виникненню та прогресуванню ускладнень ЦД2 [4].

Наразі відомо, що активація транскрипційного протеїнового комплексу HIF, який складається з трьох киснерегульованих  $\alpha$ -субодиниць (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  та HIF-3 $\alpha$ ) і кисненезалежної  $\beta$ -субодиниці, відіграє важливу роль в енергетичному метаболізмі, забезпечуючи перемикання (switch) в умовах гіпоксії мітохондріального окиснювального фосфорилування на анаеробний гліколіз, зменшуючи поглинання кисню у мітохондріях через інгібування конверсії пірувату в ацетил-КоА і таким чином (через різні сигнальні шляхи) діючи як протективний механізм, спрямований проти надмірної продукції АФК у мітохондріях [5].

В останнє десятиріччя приділяється багато уваги дослідженню регуляторного білка mTOR (the mammalian target of rapamycin) у патогенезі таких патологічних метаболічних станів, як ожиріння, рак, нейродегенеративні хвороби, а також ЦД2 [6]. mTOR є серин/треонінпротеїнкіназою, яка існує у двох мультикомплексах mTORC1 і mTORC2 із різними білковими компонентами і субстратами. Ці комплекси прямо впливають як на розвиток, так і на протекцію ОС у тканинах, діючи через різні сигнальні шляхи (HIF-1 $\alpha$ , EPO, AMPK, SIRT 1 тощо) [6]. Наші нещодавні дослідження виявили зміни експресії генів HIF-1 $\alpha$  та mTOR, спрямовані на мінімізацію розвитку ОС у хворих на ЦД2 [7].

Згідно з класифікацією метаболічних препаратів [8] армадин (2-етил-6-метил-3-гідроксипіридину сукцинат, аналог – мексидол) і тризипін (3-(2,2,2-триметилгідразиній) пропіонату дигідрату, аналоги – мілдронат, мельдоній) [9] мають точкою прикладання дії субстрати енергетичного обміну та модулятори ліпідного обміну відповідно.

Відомо, що цим препаратам властива антиоксидантна дія, що було показано у головному мозку при моделюванні хвороби Паркінсона [10] і у крові пацієнтів з цією хворобою та з ЦД2 [11, 12]. Ми вважаємо, що їх комбіноване застосування може підсилити антиоксидантні ефекти у хворих на ЦД2 і протидіяти негативному впливу ОС на молекулярно-генетичні мішені.

Метою нашої роботи було вивчення впливу комбінованого застосування лікарських препаратів армадину та тризипіну на розвиток окисного стресу у хворих на ЦД2.

## 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. Програму обстеження, інформацію для пацієнта та форму інформованої згоди погоджено комісією з питань етики цієї установи (протокол № 0025/615-21.05.2020). Умовою включення в дослідження була підписана інформована згода.

Обстежено 20 пацієнтів з ЦД2 (дослідна група), а також 12 практично здорових осіб, які ввійшли до контрольної групи (табл. 1).

Обидві групи обстежених не мали відмінностей за віком, демонстрували однаковий статевий розподіл та схожі значення індексу маси тіла (менше ніж 40 кг/м<sup>2</sup>). Концентрація в крові глікованого гемоглобіну у хворих на ЦД2 була вірогідно вищою на 45,5%, ніж у контролі. Було відмічено, що хворі мали помірну артеріальну гіпертензію та підвищений вміст ліпопротеїнів низької щільності в крові (табл. 1). В зв'язку з цими обставинами вони крім пероральної цукрознижувальної терапії (метформін, похідні сульфонілсечовини, SGLT-2 інгібітори) отримували антигіпертензивні засоби (АСЕ-інгібітори, блокатори рецепторів ангіотензину, діуретики, антагоністи каль-

Таблиця 1. Основні клінічні та антропометричні характеристики обстежених осіб з цукровим діабетом (ЦД2, М ± m)

Показники	Контроль (n = 12)	ЦД2 (n = 20)
Вік, роки	56,0±2,8	61,6±25
Чоловіки/Жінки	40% / 60%	40% / 60%
Систолічний артеріальний тиск, мм рт.ст.	130,0±2,12	140,20±4,23
Діастолічний артеріальний тиск, мм рт.ст.	82,8±2,81	81,90±1,92
Глікований гемоглобін, %	5,40±0,52	9,90±0,67*
Тривалість захворювання, роки	-	13,9±1,61
Ліпопротеїни низької щільності, ммоль/л	2,0±0,21	2,40±0,23

\*P < 0,05 щодо контролю (здорові особи).

цію), а також статини. На тлі базисної терапії хворим був проведений комбінований курс лікування препаратами армадин і тризипін за такою схемою: пероральне приймання таблеток армадину у дозі 300 мг за добу сумісно з тризипіном у таблетках у дозі 500 мг за добу впродовж 60 днів. Треба відмітити, що хворі на ЦД2 не мали протипоказань щодо поєднання цих двох засобів (ниркова чи печінкова недостатність, високий внутрішньочерепний тиск).

У крові пацієнтів, яку забирали з ліктвової вени натще до і після курсу лікування, а також у контрольної групи осіб, аналізували показники, що є маркерами розвитку ОС та стану САОЗ. Об'єктом дослідження були плазма крові та еритроцити, які виділяли із крові, що була стабілізована розчином гепарину (25 МО на 1 мл крові). Проби центрифугували при 8000 об/хв впродовж 15 хв для розподілу плазми і еритроцитів. Усі маніпуляції проводили при 4–6°C.

Для оцінки рівня окисних процесів у плазмі крові вивчали вміст вторинних продуктів ПОЛ, які реагують з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК-активні продукти) та окисну модифікацію протеїнів (ОМП) за вмістом карбонільних груп. Ці та інші біохімічні дослідження виконували за стандартними методиками, що були описані раніше [11]. Активність каталази і СОД визначали спектрофотометрично. В еритроцитах крові активність селензалежної

глутатіонпероксидази (ГП) визначали за швидкістю окиснення НАДФН. Кількість відновленого глутатіону (GSH) вивчали за допомогою реактиву Елмана. Вміст перекису водню досліджували за допомогою FOX-методу, в основу якого покладено окиснення  $Fe^{2+}$  у  $Fe^{3+}$ . Концентрацію білка визначали за допомогою метода Бредфорда, використовуючи бичачий сироватковий альбумін як стандарт.

Експресію генів HIF-1 $\alpha$  і mTOR вивчали в лейкоцитах, які одержували за допомогою подвійного центрифугування цільної крові за стандартною методикою [13]. 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 дала 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). Значення вмісту мРНК HIF-1 $\alpha$  і mTOR нормалізували за експресією конститутивного референтного гена  $\beta$ -актин, використовуючи реактиви Taq Man Human  $\beta$ -actin Control Reagent («Invitrogen», США). Рівень відносної експресії досліджуваних генів був розрахований з використанням порівнювального Ct-методу та нормалізова-

ний за експресією референтного гена (2- $\Delta\Delta C_t$ ).

Результати досліджень оброблено загальноприйнятими методами варіаційної статистики за допомогою програми “Origin 7.0”. Вірогідність розходжень між групами порівняння була визначена методом дисперсійного аналізу (ANOVA) з наступним тестом Bonferroni (post-hoc test). Результати представляли у вигляді Mean  $\pm$  SD і вважали вірогідними при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У плазмі крові хворих на ЦД2 зростав вміст продуктів ОМП у 2,5 раза на відміну від здорових осіб ( $P < 0,05$ ; рис. 1).

При різних патологічних станах саме протеїни, а не ліпіди і нуклеїнові кислоти, є первинними ефективними мішенями АФК, а їх окисна модифікація розглядається як один з надійних та чутливих маркерів окисного стресу, оскільки продукти ОМП більш стабільні, порівняно з продуктами ПОЛ і здатні виступати додатковим джерелом вільних радикалів (ВР), виснажуючи запаси таких антиоксидантів, як аскорбінова кислота та глутатіон [14]. У низці клінічних досліджень було показано значні зміни кількості продуктів ОМП, причому ступінь окисної модифікації білкової молекули корелював з тяжкістю перебігу ЦД2 [14, 15]. Нами було також встановлено значне зростання вторинних продуктів ПОЛ у крові хворих на ЦД2. Так, вміст ТБК-АП у плазмі крові збільшувався на 52% ( $P < 0,05$ ), вміст  $H_2O_2$  в еритроцитах крові – на 23% ( $P < 0,05$ ) на відміну від контрольних осіб (див. рис. 1; 3). Це узгоджується з даними сучасної літератури, де широко представлені дослідження щодо ушкоджувальної ролі інтенсифікації процесів ПОЛ за умов ЦД2 і переконливо показано накопичення в крові та тканинах пацієнтів маркерів окисного стресу [15]. Так, Niedowicz і співавт. [16], Soliman і співавт. [17] констатують значне зростання вмісту малонового діальдегіду у плазмі крові хворих

на ЦД2, що корелювало з концентрацією глюкози в крові.

Відомо, що надмірне утворення продуктів ПОЛ та ОМП має цитотоксичну дію, яка проявляється пошкодженням клітинних мембран, зростанням в'язкості білок-ліпідного шару, зниженням активності мембраноз'язаних ферментів, рецепторів тощо [14]. Раніше, Єфімов та Науменко [18] показали, що посилення перекисних процесів відіграє суттєву роль у пошкодженні еритроцитів та ендотелію судин, а також у формуванні діабетичних ангіопатій.

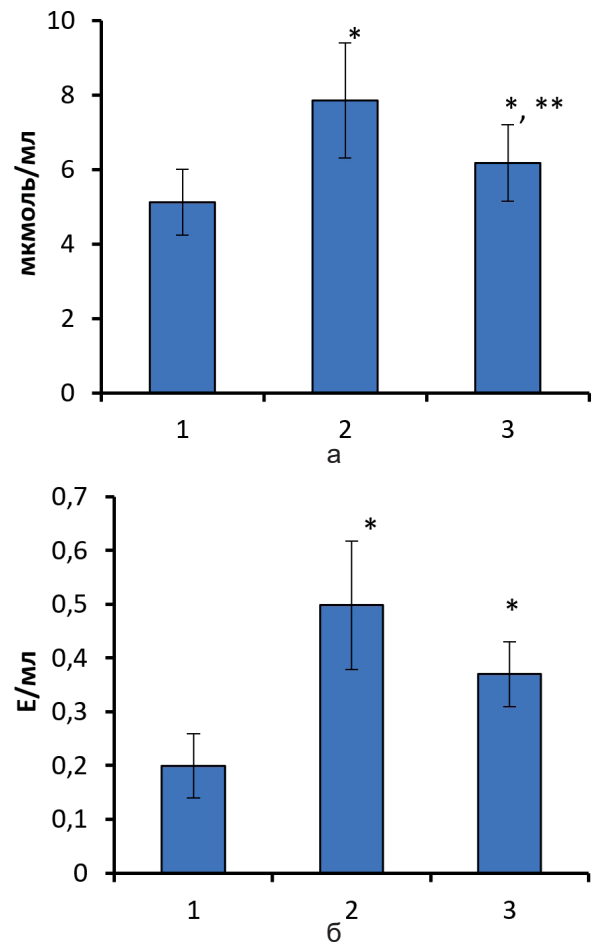


Рис. 1. Вміст ТБК-активних продуктів (а) та продуктів окисної модифікації протеїнів (ОМП) (б) у плазмі крові хворих на цукровий діабет 2-го типу (ЦД2) до та після лікування препаратами армадин та тризіпін: 1 – контроль; 2 – до лікування; 3 – після лікування. \* $P < 0,05$  порівняно з контролем; \*\* $P < 0,05$  порівняно зі значеннями при ЦД2

У хворих на ЦД2 розвиток ОС пов'язаний не тільки з надпродукцією АФК, але й зі значними змінами в ефективності антиоксидантного захисту [2, 4]. Ми досліджували активність антиоксидантних ферментів – СОД і каталази, які становлять першу лінію антиоксидантного захисту, у плазмі крові хворих на ЦД2. Було відмічено зростання активності СОД на 31% ( $P < 0,05$ ), каталази – на 83% ( $P < 0,05$ ) від показників контролю (рис. 2).

Така суттєва активація СОД і каталази свідчить про накопичення у крові хворих супероксид-аніона та пероксиду водню, які

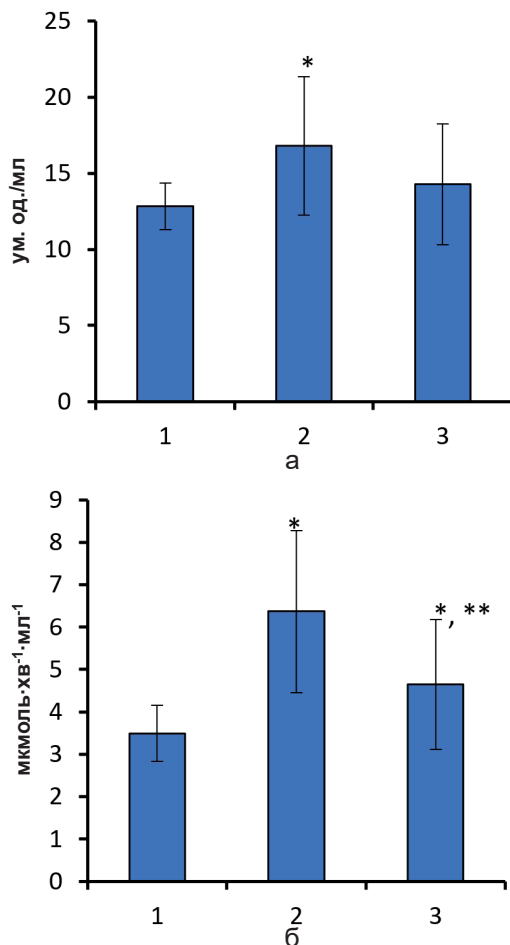


Рис. 2. Активність супероксиддисмутаз (а) та каталази (б) в плазмі крові хворих на цукровий діабет 2-го типу (ЦД2) до та після лікування препаратами армадин та тризипін: 1 – контроль; 2 – до лікування; 3 – після лікування. \* $P < 0,05$  порівняно з контролем; \*\* $P < 0,05$  порівняно зі значеннями при ЦД2

є субстратами для СОД й антиперекисного ферменту каталази відповідно. Аналогічні дані наводять у своїх дослідженнях і інші автори [2, 4, 17]. Ми можемо припустити, що встановлене надмірне зростання активності СОД і каталази у хворих на ЦД2 має адаптивно-компенсаторний характер у відповідь на гіпергенерацію АФК. Проте інформація відносно статусу антиоксидантів та активності антиоксидантних ферментів у хворих на ЦД2 у сучасній літературі є достатньо контроверсійною. Існує багато даних як про активацію САОЗ у відповідь на підвищений рівень утворення ВР і органічних та гідропероксидів, так і про можливість виснаження її адаптивної здатності [17]. Так, Bandeira і співавт. [19] повідомили про значне зниження у пацієнтів на ЦД2 активності СОД при збереженні активності каталази, що, на їх погляд, може супроводжуватися недостатньою дисмутацією радикала супероксид-аніона, який бере участь в утворенні інших, не менш агресивних АФК, з подальшим посиленням ОС [19]. Було також показано, що активність СОД та антиперекисних ферментів у крові хворих на ЦД2 залежали від тривалості та ступеня тяжкості хвороби [20].

Разом з антирадикальними ферментами система глутатіону є однією із активних складових антиоксидантного захисту організму, яка відіграє велику роль у послабленні патологічного процесу, особливо в еритроцитах, оскільки не тільки запобігає розвитку вільнорадикальних реакцій, але й забезпечує ефективну елімінацію кінцевих метаболітів ПОЛ. Слід відмітити зниження вмісту GSH на 31% ( $P < 0,05$ ) та активності ГП на 16% ( $P > 0,05$ ) в еритроцитах крові хворих на ЦД2 на відміну від контролю (рис. 3), що узгоджується з даними Mendez і співавт. [21] щодо порушень метаболізму глутатіону. Дефіцит цього трипептиду в еритроцитах свідчить про напруження антиоксидантного захисту, зміни у редокс-системі клітин, а також може бути найбільш раннім показником



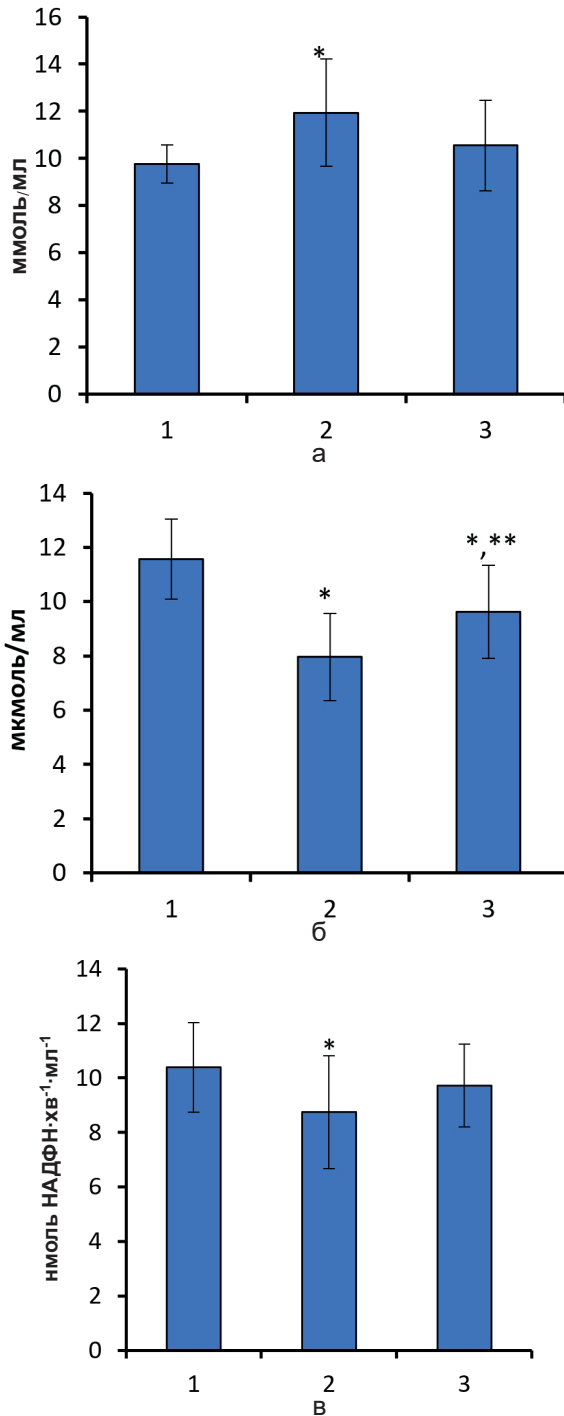


Рис. 3. Вміст H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(а), відновленого глутатіону (GSH; б) та активність глутатіонпероксидази (ГП; в) в еритроцитах крові хворих на цукровий діабет 2-го типу (ЦД2) до та після лікування препаратами армадин та тризіпін: 1 – контроль; 2 – до лікування; 3 – після лікування. \*P < 0,05 порівняно з контролем; \*\*\*P < 0,05 порівняно зі значеннями при ЦД2

посилення окисних процесів і послаблення антиоксидантного захисту у клітинах.

Існують припущення, що гіперглікемія активує поліоловий шлях окиснення глюкози, функціонування якого пов'язано з її перетворенням у сорбітол за участю альдозоредуктази, що призводить до виснаження коензиму НАДФН, потрібного для відновлення глутатіону [22]. Високий вміст глюкози, аутоокиснення якої сприяє швидкому утворенню АФК, посилює процеси окиснення GSH із втратою його захисних функцій як скевенджера ВР [21]. Існують повідомлення як про зниження, так і зростання активності ГП у крові хворих на ЦД 2. Було встановлено, що у пацієнтів з тривалим перебігом захворювання вміст глутатіону в еритроцитах був знижений на 39% (P < 0,01) на відміну від контролю, водночас вірогідно значущих змін вмісту GSH у плазмі не зареєстровано [22]. Зміна вмісту цього трипептиду тільки в еритроцитах крові (а не в плазмі) вказує на те, що глутатіон, як ключовий внутрішньоклітинний антиоксидант, на початку захворювання реалізує свій потенціал насамперед в еритроцитах. Зниження активності ГП у хворих на ЦД2 можна пояснити виснаженням GSH, котрий за умов ОС у глутатіонпероксидазній реакції виступає субстратом цього ферменту. У разі гіперглікемії це може бути викликано високою швидкістю споживання глутатіону у пентозофосфатному шляху окиснення глюкози, котрий стимулюється інсуліном, і може свідчити про напруження антиоксидантних систем захисту [21]. У наших дослідженнях встановлене зниження в еритроцитах вмісту GSH та активності антиперекисного ферменту ГП є показниками виснаження глутатіонового пулу і говорить про наявність дисбалансу у про- та антиоксидантній системі крові хворих на ЦД2.

Слід зазначити, що комбіноване застосування армадину та тризіпіну знижувало інтенсивність прооксидантних процесів у

організмі хворих на ЦД2. Про це свідчить зменшення в плазмі крові вмісту ТБК-АП на 21% ( $P < 0,05$ ), продуктів ОМП на 26% ( $P < 0,05$ ), а в еритроцитах крові – вмісту  $H_2O_2$  на 12% ( $P > 0,05$ ) порівняно з аналогічними показниками до лікування (див. рис. 1; 3). Підтвердженням уповільнення окисних процесів у хворих на ЦД2 може бути встановлене зниження активності антиперекисного ферменту каталази на 17% ( $P < 0,05$ ) та антирадикального ферменту СОД на 15% ( $P > 0,05$ ; див. рис. 2). Застосування вищезазначених препаратів посилювало антиоксидантний захист клітин крові, насамперед еритроцитів, про що свідчить вірогідне збільшення вмісту GSH в еритроцитах крові на 21% ( $P < 0,05$ ), водночас активність ГП мала лише тенденцію до зростання (див. рис. 3).

Відомо, що 3-оксипіридини, до яких належить армадин підвищують співвідношення ліпід–білок у мембранах, зменшують в'язкість мембран, тим самим модулюючи активність мембранозв'язаних ферментів (кальційнезалежної фосфодієстерази, аденілатциклази, ацетилхолінестерази), рецепторних комплексів (бензодіазепінового,  $\gamma$ -аміномасляної кислоти, ацетилхолінового). Це посилює їх можливість зв'язуватися з лігандами, сприяє збереженню структурно-функціональної організації біологічних мембран [23]. Армадин підвищує компенсаторну активацію аеробного гліколізу та знижує ступінь пригнічення окисних процесів у циклі Кребса за умов гіпоксії зі збільшенням вмісту АТФ і креатинфосфату, активує енергосинтезувальні функції мітохондрій та стабілізує клітинні мембрани елементів крові (еритроцитів і тромбоцитів). Було встановлено Vagonina [24], що мексидол підвищував чутливість тканин до дії інсуліну стимулюванням прямого окиснення глюкози в пентозофосфатному шунті, знижуючи тим самим глюкозотоксичність відносно транспортерів глюкози, інсулінових рецепторів і ферментів.

Ми вважаємо, що потужна мембрано-

протекторна дія мексидолу пов'язана насамперед з його антиоксидантними властивостями. Він активує Nrf2, котрий є головним регулятором клітинної відповіді на ОС через індукцію антиоксидантних ферментів і протеїнів, в тому числі глутатіонової антиоксидантної системи [25]. З іншого боку, цей препарат знижує активність прооксидантного транскрипційного ядерного фактора NF- $\kappa$ B, тим самим протидіючи окисним пошкодженням ДНК [23].

Застосування тризипіну, ймовірно, здатне посилювати ефекти армадину. В експериментальних та клінічних дослідженнях доведено антиоксидантну дію мельдонію через інгібування перекисного окиснення ліпідів, зменшення пошкодження мембран, яке викликається вільними радикалами [26]. Ми припускаємо, що застосування тризипіну (мельдонію) підсилює мембранопротекторну дію армадину, протидіючи реалізації патогенної дії гіперпродукції ВР на їх молекулярні мішені [9].

У нашій роботі було показано, що в лейкоцитарній фракції крові хворих на ЦД2 спостерігалася тенденція до збільшення (на 22%) експресії гена HIF-1 $\alpha$  порівняно з контролем ( $P > 0,05$ ; рис. 4, а). Відомо, що тканинна гіпоксія є незаперечним фактором, який ініціює генетичну транскрипційну адаптивну програму через систему HIFs, при чому HIF-1 $\alpha$  є тригером експресії більшості генів, відповідальних не тільки за покращення транспорту та утилізації кисню в тканинах, але і за підтримку гомеостазу глюкози та чутливості тканин до інсуліну [5, 27].

ЦД2, а також його головна складова – інсулінорезистентність, є незалежними факторами ризику тяжких порушень зовнішнього дихання і розвитку тканинної гіпоксії [27]. Нещодавно було показано, що при експериментальній інсулінорезистентності тканинна гіпоксія розвивається внаслідок порушення як системи зовнішнього дихання, так і електронно-транспортної системи

мітохондрій [28]. Також встановлено, що підвищення експресії гена HIF-1 $\alpha$  позитивно корелює зі ступенем метаболічного контролю при ЦД2 [27]. Показано, що HIF-1 $\alpha$  модулює експресію субодиниць цитохром С-оксидази та регулює індукцію PDK1, а також діє через інші механізми, що мінімізують продукцію АФК при ЦД [29]. Водночас наші генетичні дослідження виявили відсутність значущого збільшення експресії гена HIF-1 $\alpha$  у лейкоцитах крові хворих на ЦД2, що може бути пов'язано із дисрегуляцією HIF-1 $\alpha$ -сигналізації. Вона зумовлена, головним чином, високими концентраціями глікованого гемо-

глобіну і жирних кислот [5]. Отже, дисрегуляція HIF-1 $\alpha$ -сигналізації може, на нашу думку, виступати одним з молекулярно-генетичних механізмів окисного клітинного пошкодження при ЦД2.

Комбіноване застосування армადину та тризипіну підвищувало експресію гена HIF-1 $\alpha$  в лейкоцитах порівняно зі значеннями до лікування (на 42%;  $P > 0,05$ ) і це було вище, ніж з контролем (на 75%,  $P < 0,05$ ; див. рис. 4, а). Механізмами поєданого впливу цих препаратів на розвиток ОС, які контролюються за допомогою HIF-1 $\alpha$ , є стимуляція аеробного гліколізу, зниження вмісту жирних кислот, корекція процесів ліпопероксидації, перебудова експресії субодиниць цитохром С-оксидази (з COX<sub>4-1</sub> на COX<sub>4-2</sub>), пригнічення пролілгідроксилазної деградації HIF-1 $\alpha$  тощо [5]. Дослідження експресії гена регуляторного білка mTOR у лейкоцитах хворих на ЦД2 продемонстрували значне його зниження (на 52%) на відміну від контрольних значень ( $P < 0,05$ ; див. рис. 4, б).

Встановлена значна редукція гена mTOR може підсилювати окисні ураження внаслідок тісного взаємозв'язку його і цілої низки потужних метаболічних регуляторів генерації АФК: фактори росту, еритропоетин (ЕРО), такі кінази, як АМПК (AMP-activated protein kinase), протеїнкіназа В (АКt), фосфоінозитид 3-кіназа (PI<sub>3</sub>-K), а також SIRT (silent mating type information regulation 2 homolog 1) та ін. [6]. Зокрема, ЕРО впливає на mTOR-сигналізацію у послабленні ОС у різних тканинах [30, 31]. Таким чином, значне зниження експресії гена mTOR може слугувати і механізмом зростання продукції АФК, особливо в гіпоксичних умовах [32, 33].

Ми показали, що після комбінованого застосування армადину та тризипіну експресія гена mTOR у лейкоцитах хворих зростала на 30% порівняно зі значеннями до лікування ( $P > 0,05$ ), однак залишалася нижчою, ніж у контролі (див. рис. 4, б). Такий результат вка-

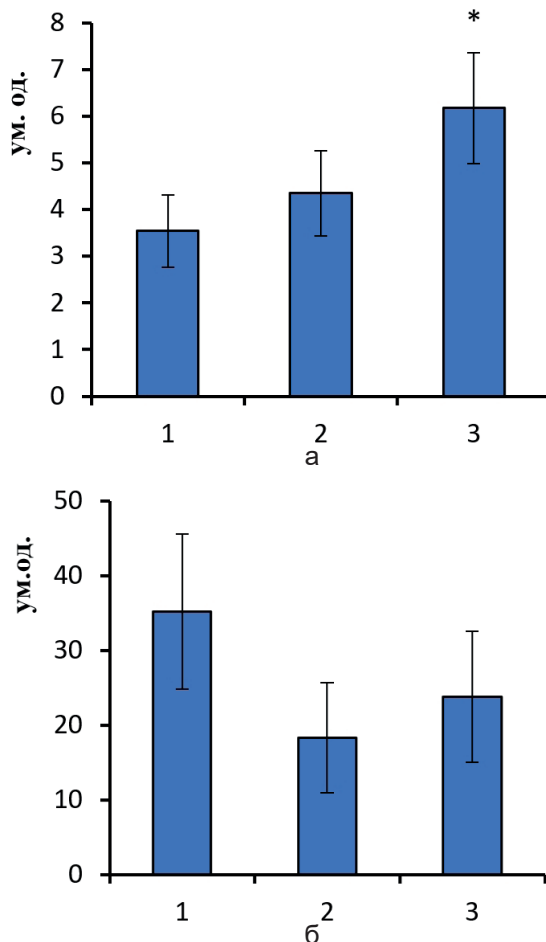


Рис. 4. Відносний рівень експресії генів mRNA HIF-1 $\alpha$ / $\beta$ -актин (а) та mRNA mTOR/ $\beta$ -актин (б) у лейкоцитах крові хворих на цукровий діабет 2-го типу: 1 – контроль; 2 – до лікування; 3 – після лікування препаратами армадин та тризипін. \* $P < 0,05$  порівняно з контролем



зує на те, що дія вищезазначених препаратів може бути пов'язана і з іншими механізмами, через дію таких метаболічних регуляторів, як ЕРО, АКТ,  $PI_3$ -К [31, 32].

Треба відмітити, що модуляція активності mTOR є багатофакторним процесом, який потребує подальшого вивчення. Але вже наразі відомо, що mTOR є привабливою цілью для нової терапевтичної стратегії при ЦД2, пов'язаної одночасно з інгібуванням окисного стресу та регуляцією метаболічного гомеостазу різних тканин, включаючи м'язову і жирову тканини, підшлункову залозу, печінку, головний мозок тощо [34].

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено значне зростання продуктів ОМП та вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів у плазмі крові хворих на ЦД2, що є чутливими біомаркерами розвитку та інтенсивності ОС.

2. Підвищення вмісту гідроперекису водню в еритроцитах та надмірне зростання активності СОД і каталази в плазмі крові відображають гіперпродукцію первинних АФК – супероксид-аніона та подальшого продукту його дисмутації  $H_2O_2$ .

3. Зниження вмісту GSH та активності антиперекисного ферменту ГП в еритроцитах є показниками виснаження глутатіонового пулу з дисбалансом у про- та антиоксидантній системі з посиленням окисних процесів.

4. Комбіноване застосування армадину і тризипіну призводило до зменшення рівнів ОМП і ПОЛ та вмісту гідроперекису водню, а також до підвищення концентрації GSH та активності ГП у крові, що свідчило про зниження інтенсивності ОС та його впливу на молекулярні мишені.

5. Застосування армадину і тризипіну усувало дисрегуляцію HIF-1 $\alpha$ -сигналізації, що гальмувало надмірну генерацію АФК через різні прямі і непрямі механізми.

6. Комбіноване застосування армадину і тризипіну не впливало на компенсаторне

зменшення експресії гена mTOR, що протидіяло розвитку ОС, але відносно зростання цього показника після лікування може вказувати на підвищення ролі mTOR-сигналізації в мінімізації окисного стресу через дію різних метаболічних регуляторів (ЕРО, АМПК, АКТ,  $PI_3$ -К, SIRT).

*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.*

Ya.A. Saenko<sup>1</sup>, O.O. Gonchar<sup>2</sup>, I.M. Mankovska<sup>2</sup>,  
T.I. Drevytska<sup>2</sup>, O.O. Klymenko<sup>2</sup>,  
B.M. Mankovsky<sup>1</sup>

## EFFECT OF DRUGS WITH METABOLIC ACTION ON OXIDATIVE STRESS DEVELOPMENT IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS

<sup>1</sup>Government Institution The Scientific and Practical Medical Center of Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery of the Ministry of Health of Ukraine, Kyiv;  
<sup>2</sup>Bogomoletz Institute of Physiology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; e-mail: olga.gonchar@i.ua

It was shown that the combined oral use of drugs with a metabolic effect - armadine at a dose of 300 mg per day and trizipin at a dose of 500 mg per day for 60 days led to inhibition of the oxidative stress damaging effect on its molecular genetic targets - proteins, lipids, and DNA - in blood of patients with type 2 diabetes mellitus (DM2). This is evidenced by a decrease in the proteins' oxidative modification level and the content of lipid peroxidation secondary products in blood plasma and changes in the expression of the transcription factor HIF-1 $\alpha$  and the regulatory protein mTOR genes in leukocytes of patients with DM2. This occurred against the background of a fall in the hydrogen peroxide production in erythrocytes of patients with DM2 and an increase in the activity of antiradical defense and the glutathione antioxidant system in plasma and erythrocytes of these patients after treatment. Genetic studies indicated that the use of armadine in combination with trizipin significantly raised the expression of the HIF-1 $\alpha$  gene and reduced the decrease in the expression of the mTOR gene in blood leukocytes of patients with type 2 diabetes mellitus. The established changes can serve as a protective mechanism that counteracts the development of oxidative damage of macromolecules through various signaling metabolic pathways.

Key words: armadine; trizipin; oxidative stress; HIF-1 $\alpha$ ; mTOR; type 2 diabetes mellitus.

## REFERENCES

- Kayama Y, Raaz U, Jagger A, Adam M, Schellinger I, Sakamoto M, Suzuki H, Toyama K, Spin JM, Tsao PS. Diabetic cardiovascular disease induced by oxidative stress. *Int J Mol Sci.* 2015;16(10):25234-63.
- Moussa SA. Oxidative stress in diabetes mellitus. *Roman J Biophys.* 2008;18:225-36.
- Mellbin LG, Anselmino M, Lars R. Diabetes, prediabetes and cardiovascular risk. *Eur J Cardiovascul Prev Rehabil.* 2010;17(1\_suppl):s9-14.
- Mokryi VYa, Ziablitsev SV, Borys RM. Violations of the system of lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus. *Mizhnar Endokrin Zh.* 2021;17(7.71):41-4. [Ukrainian].
- Gunton JE. Hypoxia-inducible factors and diabetes. *J Clin Invest.* 2020;130(10):5063-73.
- Maiese K. Novel nervous and multi-system regenerative therapeutic strategies for diabetes mellitus with mTOR. *Neural Regen Res.* 2016;11(3):372-85.
- Saenko Y, Gonchar O, Mankovska I, Drevytska T, Bratus L, Mankovsky B. Oxidative stress in type 2 diabetic patients: involvement of HIF-1 alpha AND mTOR genes expression. *Ukr Biochem J.* 2023;95(2):48-57.
- Chekman IS, Gorchakova NO, Nagorna OO, Nebesna TU. Nicotinamide. Kyiv: Polygraph Plus. 2008.
- Gorchakova NO. Meldonium prolonged medicinal form (Trizipin® long) -acquisition of national pharmacology and pharmacy. *Ukr Med Chasopis.* 2015;51-3. [Ukrainian].
- Mankovska IM, Gonchar OO, Bratus LV. The effect of mexidol on glutathione system in rat brain under modeling of Parkinson's disease. *Fiziol Zh.* 2022;68(1):13-9. [Ukrainian].
- Gonchar OO, Klymenko OO, Drevytska TI, Bratus LV, Mankovska IM. Oxidative stress in rat heart mitochondria under a rotenone model of Parkinson' disease: a corrective effect of capicor treatment. *Ukr Biochem J.* 2021;93(5):21-30.
- Mankovska IM, Rosova KV, Gonchar OO, Nosar VI, Bratus LV, Drevytska TI, Glazyrin ID, Karasevich NV, Karaban IM. Effect of capicor on the Parkinson's disease pathogenic links. *Fiziol Zh.* 2018; 64(1):16-24. [Ukrainian].
- Saenko YA, Gonchar OO, Mankovska IM, Drevytska TI, Bratus LV, Mankovsky BM. The effect of actovegin on the mechanisms of oxidative stress developing in patients with type 2 diabetes mellitus and cardiovascular autonomic neuropathy. *Fiziol Zh.* 2023;69(5):12-21. [Ukrainian].
- Pandey KB, Mishra N, Rizvi SI. Protein oxidation biomarkers in plasma of type 2 diabetic patients. *Clin Biochem.* 2010; 43(4-5):508-11.
- Kumawat M, Pahwa MB, Gahlaut VS, Singh N. Status of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus with microvascular complications. *Open Endocrinol J.* 2009;3:12-5.
- Niedowicz DM, Daleke DL. The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem Biophys.* 2005;43(2):289-330.
- Soliman GZA. Blood lipid peroxidation (superoxide dismutase, malondialdehyde, glutathione) levels in Egyptian type 2 diabetes patients. *Singapore Med J.* 2008;49:129-36.
- Yefimov AS, Naumenko VG. Lipid peroxidation in erythrocytes of diabetic patients with diabetic angiopathy. *Probl Endocrinol.* 1985;(1):6-9. [Ukrainian].
- Bandeira S de M, Guedes Gda S, da Fonseca LJ, Pires AS, Gelain DP, Moreira JC, Rabelo LA, Vasconcelos SM, Goulart MO. Characterization of blood oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients: increase in lipid peroxidation and SOD activity. *Oxid Med Cell Long.* 2012;2012:1-13.
- Promyos N, Phienluphon PP, Wechjakwen N, Lainampetch J, Prangthip P, Kwanbunjan K. Inverse correlation of superoxide dismutase and catalase with type 2 diabetes among rural thais. *Nutrients.* 2023;15(9):2071.
- Mendez MM, Folgado J, Tormo C, Artero A, Ascaso M, Martinez-Hervás S, Chaves FJ, Ascaso JF, Real JT. Altered glutathione system is associated with the presence of distal symmetric peripheral polyneuropathy in type 2 diabetic subjects. *J Diabet Complicat.* 2015;29(7):923-7.
- Kolesnichenko T, Bardimova E, Sergeeva M, Sergeeva N, Verlan N, Belousova I. Glutathione antioxidant system in patients with diabetes mellitus. 2008;2(5). *J Clin Lipid.* 2008;2(5):124-5.
- Torshin IYu, Gromova OA, Sardaryan IS, Fedotova LE. A comparative chemoreactome analysis of mexidol. *Zh Nevrol Psikhiatr.* 2017;117(2):75.
- Voronina TA. Cognitive impairment and nootropic drugs: mechanism of action and spectrum of effects. *Neurochem J.* 2023;17(2):180-8.
- Reisman SA, Lee CYI, Meyer CJ, Proksch JW, Ward KW. Topical application of the synthetic triterpenoid RTA 408 activates Nrf2 and induces cytoprotective genes in rat skin. *Arch Dermatol Res.* 2013;306(5):447-54.
- Klusa V, Beitnere U, Pupure J. Mildronate and its neuroregulatory mechanisms:targeting the mitochondria, neuroinflammation, and protein expression. *Medicina (Kaunas).* 2013;49(7):301-9.
- López-Cano C, Gutiérrez-Carrasquilla L, Barbé F, Sánchez E, Hernández M, Martí R, Ceperuelo-Mallafre V, Dalmases M, Fernández-Veledo S, Vendrell J, Hernández C, Simó R, Lecube A. 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(8):2632-2.
- Zavorodnii MO, Nosar VI, Gonchar OO, Tsapenko PK, Kozlovska MG, Vasylenko MI, Portnychenko VI, Portnychenko AG. Blockade of L-type calcium channels alters hepatic mitochondrial function in insulin-resistant rats. *Fiziol Zh.* 2023;69(6):88-96.
- Persson P, Palm F. Hypoxia-inducible factor activation in diabetic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hyperten.*

- 2017;26(5):345-50.
30. Laplante M, Sabatini David M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012;149(2):274-93.
31. Yu T, Li L, Chen T, Liu Z, Liu H, Li Z. Erythropoietin attenuates advanced glycation endproducts-induced toxicity of Schwann cells in vitro. *Neurochem Res*. 2015;40(4):698-712.
32. Sanghera KP, Mathalone N, Baigi R, Panov E, Wang D, Zhao X, Hsu H, Wang H, Tropepe V, Ward M, Boyd SR. The PI3K/Akt/mTOR pathway mediates retinal progenitor cell survival under hypoxic and superoxide stress. *Mol Cell Neurosci*. 2011;47(2):145-53.
33. Wang L, Di L, Noguchi CT. AMPK is involved in mediation of erythropoietin influence on metabolic activity and reactive oxygen species production in white adipocytes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;54:1-9.
34. Mao Z, Zhang W. Role of mTOR in glucose and lipid metabolism. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(7):2043.

*Матеріал надійшов  
до редакції 05.04.2024*