

## Обмін ліпідів при експериментальному цукровому діабеті та його корекція ніацин-оксіетилідендифосфонатогерманатом

Н. В. Кресюн, Г. О. Сон, В. В. Годован, Л. С. Годлевський

Одеський національний медичний університет, Україна

Розроблення методів контролю порушень обміну ліпідів, а також вмісту глюкози крові при цукровому діабеті може здійснюватись шляхом застосування германій-вміщувальних біологічно активних речовин. Однією з перспективних сполук є ніацин-оксіетилідендифосфонатогерманат (МІГУ-4), що ефективно коригує стан ліпідного шару мембран мітохондрій печінки на моделі стрептозотозин-індукованого діабету.

**Мета роботи** – визначення динаміки вмісту загального холестерину, загальних фосфоліпідів, їхнього молярного співвідношення та спектра фосфоліпідів мембран еритроцитів і мітохондрій печінки при експериментальному цукровому діабеті та його корекції комплексною сполукою германію з нікотиною кислотою – МІГУ-4 та препаратом інсуліну.

**Матеріали та методи.** Діабет викликали в щурів-самців лінії Вістар внутрішньоочеревинно застосуванням стрептозотозину (50,0 мг/кг). МІГУ-4 застосовували внутрішньоочеревинно дозою  $ED_{50}$ , що становила 25,0 мг/кг. Мембрани клітин отримували з еритроцитів, а мембрани мітохондрій – за допомогою диференційного центрифугування тканини печінки. Ліпідні екстракти виділяли з 1 мл еритроцитів і 200 мг тканини печінки, фракціонування фосфоліпідів виконали методом одномірної висхідної тонкошарової хроматографії. Вміст окремих фосфоліпідів оцінювали шляхом «згорання» плям за допомогою 72 % хлорної кислоти при 200 °С до їх повного знебарвлення з наступним визначенням ліпідного фосфору. Вміст загальних фосфоліпідів розраховували за сумою окремих фракцій.

**Результати.** Через два тижні після відтворення моделі стрептозотозинового цукрового діабету суттєво збільшувався рівень загального холестерину та зменшувався вміст загальних фосфоліпідів у мембранах еритроцитів, мітохондрій печінки щурів, що призводило до зростання молярного коефіцієнта холестерин/фосфоліпіди. Ці зміни досягали максимальних величин на другому місяці дослідження. Водночас відбувалось зміщення спектра різних фракцій фосфоліпідів: підвищувався вміст важкоокиснюваних (лізофосфатидилхоліну та сфінгомієліну) при катастрофічному зменшенні легкоокиснюваних (фосфатидилхоліну, фосфатидилетаноламіну), що свідчило про напруженість компенсаторних механізмів підтримки стабільності «плинності» мембран. Профілактично-лікувальне введення окремо препарату інсуліну та біологічно активної речовини МІГУ-4 дещо зменшувало негативний вплив проявів цукрового діабету на вміст загальних фосфоліпідів та їхніх фракцій. Сумісне застосування цих речовин достеменно запобігало дискоординації у клітинних мембранах як вмісту загальних фосфоліпідів, їхніх фракцій, так і загального холестерину та коефіцієнта холестерин/фосфоліпіди.

**Висновки.** Застосування МІГУ-4 запобігає виникненню порушень ліпідного обміну – вмісту загальних фосфоліпідів та їхніх фракцій у мембранах клітин і мітохондрій при стрептозотозин-індукованому діабеті.

## Обмен липидов при экспериментальном сахарном диабете и его коррекция ниацин-оксиэтилдендифосфонатогерманатом

Н. В. Кресюн, А. А. Сон, В. В. Годован, Л. С. Годлевский

Разработка методов контроля нарушений обмена липидов, а также содержания глюкозы в крови при сахарном диабете может осуществляться путём применения германий-содержащих биологически активных веществ. Одним из перспективных соединений является ниацин-оксиэтилдендифосфонатогерманат (МИГУ-4), который эффективно корригирует состояние липидного слоя мембран митохондрий печени на модели стрептозотозин-индуцированного диабета.

**Цель работы** – определить динамику содержания общего холестерина, общих фосфолипидов, их молярного соотношения, спектра фосфолипидов мембран эритроцитов и митохондрий печени при экспериментальном сахарном диабете, а также в условиях коррекции применением комплексного соединения германия с никотиновой кислотой – МИГУ-4 и препаратом инсулина.

**Материалы и методы.** Диабет вызывали у крыс-самцов линии Вистар внутрибрюшинно применением стрептозотозина (50,0 мг/кг). МИГУ-4 применяли внутрибрюшинно в дозе  $ED_{50}$ , которая составляла 25,0 мг/кг. Мембраны клеток получали из эритроцитов, а мембраны митохондрий – с помощью дифференциального центрифугирования ткани печени. Липидные экстракты выделяли из 1 мл эритроцитов и 200 мг ткани печени, фракционирование фосфолипидов проводили методом одномерной восходящей тонкослойной хроматографии. Содержание отдельных фосфолипидов оценивали путём «сгорания» пятен с применением 72 % хлорной кислоты при 200 °С до их полного обесцвечивания с последующим определением липидного фосфора. Содержание общих фосфолипидов рассчитывали путём суммирования показателей отдельных фракций.

**Результаты.** Через две недели после воспроизведения стрептозотозинового диабета существенно увеличивался уровень общего холестерина и уменьшалось содержание общих фосфолипидов в мембранах эритроцитов и митохондрий печени крыс, что приводило к увеличению молярного коэффициента холестерин/фосфолипиды. Эти изменения достигали максимальных величин на втором месяце исследований. Одновременно происходило смещение спектра разных фракций фосфолипидов: повышалось содержание тяжелоокисляемых (лизофосфатидилхолина и сфингомиелина) при катастрофическом уменьшении легкоокисляемых (фосфатидилхолина, фосфатидилэтанолamina), что свидетельствовало о нарушении компенсаторных механизмов поддержки стабильности «текучести» мембран. Лечебно-профилакти-

**Ключові слова:**  
стрептозотозин, цукровий діабет, холестерин, фосфоліпіди, мембрани, інсулін.

**Запорізький медичний журнал.** – 2017. – Т. 19, № 4(103). – С. 497–503

**DOI:**  
10.14739/2310-1210.2017.4.105274

**E-mail:**  
godlevsky@odmu.edu.ua

**Ключевые слова:**  
стрептозотозин, сахарный диабет, холестерин, фосфолипиды, мембраны, инсулин.

**Запорожский медицинский журнал.** – 2017. – Т. 19, № 4(103). – С. 497–503

тическое введение отдельно препарата инсулина и биологически активного вещества МИГУ-4 несколько уменьшало негативное влияние последствий сахарного диабета на содержание общих фосфолипидов и их фракций. Совместное применение этих веществ достоверно предупреждало дискоординацию в клеточных мембранах как содержания общих фосфолипидов, их фракций, так и общего холестерина и коэффициента холестерин/фосфолипиды.

**Выводы.** Применение МИГУ-4 предотвращает развитие нарушений липидного обмена: изменения содержания фосфолипидов и их фракций в мембранах клеток и митохондрий при стрептозототцин-индуцированном диабете.

**Key words:**

experimental streptozotocin, diabetes mellitus, cholesterol, phospholipids, membrane, insulin.

Zaporozhye medical journal 2017; 19 (4), 497–503

## Lipid metabolism in streptozotocin induced experimental diabetes and it's correction with niacin-oxyethylidendiphosphonatogermanate

N. V. Kresyun, A. A. Son, V. V. Godovan, L. S. Godlevsky

**Introduction.** The development of approaches for effective control of diabetes-induced deterioration of lipid metabolism and plasma glucose level could be implemented by the applying of germanium-contained biologically active substances. Among others such compound as niacin – oxyethylidendiphosphonatogermanate (MIGU-4) should be mentioned, which is able to correct effectively the lipid layers of liver mitochondrial membranes on models of streptozotocin – induced diabetes.

**Aim.** To investigate the dynamic changes of the total cholesterol, total phospholipids level along with their molar ratio; fractions of phospholipids of both erythrocyte membranes and liver mitochondria membranes in experimental diabetes mellitus and to investigate the mentioned indices under conditions of complex correction by MIGU-4 and insulin.

**Materials and methods.** Diabetes was induced in male Wistar rats with streptozotocin injection (50.0 mg/kg, i. p.). ED<sub>50</sub> of MIGU-4 (25.0 mg/kg, i. p.) was used. Cellular membranes were obtained from erythrocytes, and mitochondrial membranes were obtained through differential centrifugation of liver tissue. Lipid extracts were isolated from 1 g of erythrocyte mass and from 200 mg of liver tissue; phospholipids fractionation was carried out by method of ascending one-dimensional thin-layer chromatography. Content of certain phospholipids was estimated by method of spots "burning out" using the 72 % chloride acid at 200 °C up to their complete bleaching with the consequent determination of lipids phosphate. The level of total phospholipids was calculated by summing up all fractions content.

**Results.** The total cholesterol level substantially elevated along with the decreasing of phospholipids content in both erythrocyte and mitochondrial membranes obtained from liver tissue in two weeks after experimental streptozotocin diabetes induction in rats. It resulted in an increase of the cholesterol/ phospholipids ratio. These changes reached the maximal expression of mentioned deteriorations during the second month from the moment of diabetes induction. This was paralleled by a shift of phospholipids fractions which manifested in the increase of fractions which were relatively resistant to oxidation (lysophosphatidylcholine, sphingomyelin) along with the drastic dropping down of fractions which were easily oxidized (phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine), and that indicated violation of membrane fluidity maintaining compensatory mechanisms. Separate administration of insulin and MIGU-4 slightly decreased the negative influence of diabetes-induced deteriorations on both total phospholipids and their fractions content. Combined administration of insulin and MIGU-4 was resulted in significant prevention of the diabetes-induced disturbances of total and fractional phospholipids as well as disturbances of cholesterol/ phospholipids coefficient.

**Conclusions.** The application of MIGU-4 prevents the streptozotocin diabetes-induced lipid metabolism disturbances in a form of total phospholipids and their fractions content violation in cellular and mitochondrial membranes.

У попередній роботі довели, що стрептозототцин-індукований цукровий діабет (ЦД) призводить до виразних морфофункціональних змін мембран митохондрий печінки щурів [1]. За допомогою флуоресцентного зондування мембран встановили: ЦД істотно змінює морфофункціональний стан поверхневих шарів мембран, про що свідчило зменшення більше ніж у 8 разів сумарної флуоресценції при одночасному зростанні в 5 разів константи зв'язування та кількості центрів зв'язування зонда, зменшенні в 4 рази константи дисоціації зонда як величини, оберненої до константи зв'язування. Вивчення глибших шарів мембран засвідчило, що вони теж суттєво змінювались, але не так різко, як поверхневі. Сумісне застосування інсуліну та перспективної біологічно активної речовини (БАР) – ніацин-оксїетилідендифосфонатогерманту (під робочою назвою МИГУ-4) виявило можливість значної корекції морфофункціонального стану мембран клітин.

Виходячи з викладеного, постало завдання щодо дослідження глибинних змін у мембранах клітин. При цьому було цікаво простежити ці зміни не тільки в мембранах митохондрий печінки, а й мембранах еритроцитів.

Відомо, що основу клітин і субклітинних структур становлять фосфолипідні (ФЛ) мембран, а саме: сфінго-,

гліколіпідні, стероїди (холестерин – ХС). Важливо відзначити й те, що мембрани клітин містять у собі до 65 % ФЛ. Враховуючи питому вагу ФЛ у складі мембран, органи за вмістом ФЛ розміщуються в такий спосіб: печінка, головний мозок, серце та еритроцити [2]. Структурну основу всіх мембран становить подвійний шар (бішар) ліпідів, кожна молекула якого має гідрофільну головку та 2 гідрофобних хвостів. Крім ФЛ і ХС, до складу клітинних мембран входять інтегральні (що проникають крізь ліпідний бішар) і периферичні (пов'язані тільки з однією поверхнею мембрани) білки, вуглеводи у вигляді гліколіпідів і глікопротеїнів [3]. Ці білки відіграють роль рецепторів для гормонів, у тому числі інсуліну, ліків і транспортних (маркерних) ферментів типу АТФ-аз, 5'-нуклеотидаз тощо [4]. Важливим елементом є те, що ФЛ, окрім власне основного – структурних функцій, виконують й інші, як-от: активують мембранні та лізосомальні ферменти, беруть активну участь у проведенні нервового імпульсу, процесах зсідання крові, реакціях імунітету, регенерації тканин, перенесенні електронів у ланцюзі дихальних ферментів (тканинне дихання) тощо. Відзначимо, що роль ФЛ у метаболізмі зумовлена наявністю в них лабільних метильних радикалів – CH<sub>3</sub>, які є надзвичайно необхідними для багатьох біосинтетичних

процесів в організмі [5,6]. З іншого боку, відомо, що молекули фосфоліпідів деформуються, а потім руйнуються саме в тому місці, де на мембрану діє несприятливий чинник зовнішнього й внутрішнього середовища. Деформовані молекули чи їхні фрагменти залишають клітинну мембрану, а їхнє місце займають інші фосфоліпідні молекули, що нівелюють дефект, котрий утворений пошкодженням. Біосинтез ФЛ найактивніше відбувається в печінці, що й зумовлює вивчення їхнього вмісту в мембранах мітохондрій при експериментальній патології [6]. Поряд із цим ФЛ синтезуються в стінці кишечника, статевих і молочних залозах. Значною мірою ФЛ надходять в організм із харчовими продуктами. Не менш важливим є і те, що ФЛ мають виразну антиоксидантну дію, котра реалізується шляхом пригнічення утворення в організмі високотоксичних вільних радикалів, які пошкоджують клітинні мембрани [7].

Одним із традиційних і виправданих підходів до вивчення патогенетичних механізмів ушкодження клітинних мембран, фундаментальних знань загальних закономірностей, особливостей їхнього функціонування є дослідження молекулярної організації мембран еритроцитів. Вибір мембран еритроцитів як об'єкта дослідження зумовлений тим, що в еритроциті присутні загальні принципи молекулярної організації плазматичних мембран. Саме ці закономірності зміни структури та функції мембран еритроцитів екстраполюються на інші мембранні системи [8]. У наших досліджах це – мембрани мітохондрій печінки щурів [9].

Відзначимо, що ФЛ (як складні ліпіди) містять жирні кислоти, фосфорну кислоту та додаткову групу атомів, котра частіше всього представлена азотом. Крім побудови клітинних мембран, ФЛ бере участь у транспорті жирів, жирних кислот і ХС. Якщо ФЛ забезпечують пластичні властивості та плинність мембран, то ХС – жорсткість і стабільність. І ФЛ, і ХС часто входять до складу ліпопротеїдів мембран клітин, а також перебувають у них у вільному (не зв'язаному з білками) стані. Співвідношення ХС/ФЛ переважно й визначає плинність або жорсткість клітинної мембрани. Між плазмою крові та еритроцитами відбувається постійний обмін ФЛ, які відіграють важливу роль у підтримці в розчинному стані неполярних ліпідів [3]. Через більшу гідрофільність, ніж у ХС, завдяки наявності в молекулі залишків фосфорної кислоти, ФЛ є своєрідними «розчинниками» для ХС та інших високогідрофобних сполук. Важливо відзначити, що співвідношення ХС/ФЛ у складі ліпопротеїдів плазми крові, поряд із молекулярною вагою ліпопротеїдів, визначає ступінь розчинності ХС і його атерогенні властивості.

## Мета роботи

Визначення динаміки вмісту загального холестерину, загальних фосфоліпідів, їхнього молярного співвідношення та спектра фосфоліпідів мембран еритроцитів, мітохондрій печінки при експериментальному цукровому діабеті та його корекції комплексною сполукою германію з ніотиною кислотою – ніацин-оксїетилідендифосфонатогерманатом, і препаратом інсуліну.

## Матеріали і методи дослідження

Дослідження здійснили в умовах хронічного експерименту на 149 щурах-самцях лінії Вістар 170–320 г згідно з

вимогами комісії з питань біоетики Одеського національного медичного університету.

ЦД моделювали внутрішньоочередним (в/о) введенням стрептозотоцину (СТЗ, «Sigma Aldrich.ru») натщесерце дозою 50 мг/кг, який попередньо розчиняли в буферному натрієво-цитратному розчині (рН 4,5) [10]. У спостереженнях використовували тих щурів, у яких вміст глюкози у крові був не нижче ніж 16,7 ммоль/л.

У дослідженнях використовували препарат інсуліну актрапід НМ («Novo Nordiks, Данія»), що вводили за 30–40 хв до приймання їжі тваринами. Ніацин-оксїетилідендифосфонатогерманат (МІГУ-4, що синтезований під керівництвом професора І. Й. Сейфулліної в Одеському національному університеті імені І. І. Мечникова) застосовували в/о у дозі  $E_{D_{50}}$  25,0 мг/кг маси. Щурам групи контролю за аналогічних умов вводили 0,5 мл 0,9 % фізіологічного розчину натрію хлориду.

У ліпідних екстрактах еритроцитів визначали вміст загального ХС і загальних ФЛ у ммоль/л і розраховували їхнє молярне співвідношення, що показували коефіцієнтом ХС/ФЛ. Кров отримували з хвостатої вени щурів. Паралельно в ліпідних екстрактах мембран мітохондрій печінки щурів, які отримували шляхом диференційного центрифугування, визначали вміст загального ХС і загальних ФЛ у мг/г і розраховували їхнє співвідношення [11]. Виділення мембран еритроцитів і мітохондрій здійснювали автоматичним їх прокачуванням із реєстрацією та контролем на СФ «Uvikor D-Ш—2089 LKB» фірми «Beckman» із графічною реєстрацією піків переходу середовищ і заміром їхніх об'ємів. Контроль чистоти виділення мембран виконали за допомогою мікроскопа. Ліпідні екстракти виділяли з 1 мл еритроцитів і 200 мг тканини печінки за методом J. Folch et al. [11]. Фракціонування ФЛ здійснили методом одномірної висхідної тонкошарової хроматографії [12].

Вміст окремих фосфоліпідів – лізофосфатидилхоліну (ЛФХ), сфінгомієліну (СФМ), фосфатидилхоліну (ФХ), фосфатидилетаноламіну (ФЕА) та фосфатидилсерину (ФС) оцінювали шляхом «згорання» плям за допомогою 72 % хлорної кислоти при 200 °С до їхнього повного знебарвлення з наступним визначенням ліпідного фосфору [12]. Вміст загальних ФЛ розраховували за сумою окремих фракцій. Як відомо за даними наукової літератури, сума неорганічного фосфору, визначеного у ЛФХ, СФМ, ФХ, ФЕА та ФС, становить приблизно 75–80 % фосфору від решти фосфоліпідів і фосфатних кислот (ФФК) [3].

Статистичний аналіз даних здійснили за допомогою програмних пакетів Microsoft Excel, «Primer Biostatistics» (США). Використовувались критерії параметричної статистики. Рівень  $p < 0,05$  вважали вірогідним.

## Результати та їх обговорення

Першочергове завдання цього дослідження – вивчення динаміки вмісту загального ХС, загальних ФЛ та їхнього молярного співвідношення в мембранах еритроцитів і мембранах мітохондрій печінки щурів при стрептозотин-викликаному діабеті та його довільному відновленні.

Аналіз даних, що одержали, свідчить: розвиток експериментального ЦД супроводжується суттєвою зміною цих показників як у мембранах еритроцитів, так і мітохондрій печінки. Так, через два тижні після відтворення ЦД

**Таблиця 1.** Динаміка вмісту загального холестерину, загальних фосфоліпідів та їхнього молярного співвідношення в мембранах мітохондрій печінки щурів при експериментальному цукровому діабеті та довільному відновленні (мг/г, n=9)

№ п/п	Умови експерименту	Статистичні показники	Загальний ХС	Загальні ФЛ	Співвідношення ХС/ФЛ
1	Контроль	M±m	3,24±0,18	3,71±0,12	0,87±0,07
		%	100,0	100,0	100,0
2	Діабет (2 тижні)	M±m	4,92±0,20	2,93±0,08	1,68±0,13
		%(2-1)	159,4*	79,0*	193,1*
3	Діабет (1 міс.)	M±m	5,51±0,21	1,71±0,07	3,22±0,19
		%(3-1)	170,1*	46,1*	370,1*
4	Діабет (2 міс.)	M±m	5,89±0,12	1,84±0,11	3,20±0,18
		%(4-1)	181,8*	49,5*	367,8*
5	Діабет (3 міс.)	M±m	6,04±0,15	2,16±0,09	2,80±0,10
		%(5-1)	186,4*	58,2*	321,8*
6	Діабет (6 міс.)	M±m	5,75±0,19	2,43±0,13	2,37±0,09
		%(6-1)	177,5*	65,5*	272,4*

\*: p<0,05 щодо контролю.

**Таблиця 2.** Динаміка вмісту загального холестерину, загальних фосфоліпідів та їхнього молярного співвідношення в мембранах еритроцитів щурів при експериментальному цукровому діабеті та довільному відновленні (ммоль/л, n=9)

№ п/п	Умови експерименту	Статистичні показники	Загальний ХС	Загальні ФЛ	Співвідношення ХС/ФЛ
1	Контроль	M±m	4,01±0,20	4,65±0,19	0,86±0,05
		%	100,0	100,0	100,0
2	Діабет (2 тижні)	M±m	5,21±0,17	3,95±0,12	1,32±0,08
		%(2-1)	129,9*	84,9*	153,5*
3	Діабет (1 міс.)	M±m	5,97±0,19	3,25±0,13	1,84±0,09
		%(3-1)	148,9*	69,9*	213,9*
4	Діабет (2 міс.)	M±m	5,81±0,14	3,31±0,15	1,75±1,06
		%(4-1)	144,9*	71,2*	203,5*
5	Діабет (3 міс.)	M±m	5,76±0,15	3,85±0,09	1,50±0,05
		%(5-1)	143,6*	82,8*	174,4*
6	Діабет (6 міс.)	M±m	6,02±0,13	4,15±0,10	1,45±0,09
		%(6-1)	150,1*	89,2	168,6*

\*: p<0,05 щодо контролю.

рівень загального ХС у мембранах мітохондрій печінки збільшувався в 1,5 раза, а загальних ФС зменшувався на 30 %, що призводило до зміни співвідношення ХС/ФЛ (табл. 1).

Якщо в контролі коефіцієнт ХС/ФЛ становив 0,87±0,07, то через два тижні після введення СТЗ – 1,68±0,13 (p<0,05), тобто збільшувався у 2,0 раза.

Ці зміни в мембранах мітохондрій печінки продовжували зростати та досягли піку в розвитку на другому місяці експериментального ЦД. Вміст загального ХС збільшувався майже у 2,0 раза (5,89±0,12 порівняно з 3,24±0,18 мг/г у контролі, p<0,05), а вміст загальних ФС зменшувався у 2,0 раза (1,84±0,11 порівняно з 3,71±0,12 мг/г у контролі, p<0,05). При цьому коефіцієнт ХС/ФЛ збільшувався більш ніж у 3,5 раза (3,20±0,18 порівняно з 0,87±0,07 у контролі, p<0,05). Ці зміни залишалися такими протягом шести місяців спостереження з тенденцією до деякого поліпшення.

Порівнюючи зміни вмісту ХС і ФЛ у мембранах мітохондрій печінки щурів при ЦД зі змінами аналогічних показників у мембранах еритроцитів, слід відзначити, що вони мали односпрямований характер (табл. 2).

Так, на другому місяці спостереження на тлі нелікованого СТЗ-викликаного діабету вміст загального ХС

порівняно з контролем підвищувався на 44,9 % (p<0,05), вміст загальних фосфоліпідів зменшувався на 28,8 % (p<0,05), а їхнє молярне співвідношення становило 1,75±1,06 порівняно з 0,86±0,05 ммоль/л у контролі (p<0,05), тобто збільшувалося до 203,5 %. Враховуючи те, що зміни в мембранах еритроцитів свідчать про системні закономірності організму, можна припустити: ці порушення є універсальними для характеристики діабетичних уражень.

Слід також зазначити й те, що збільшення вмісту ХС і зменшення ФЛ, а також їхнього молярного співвідношення спостерігалось у ті самі часові проміжки, що і в мембранах мітохондрій, але ці зміни були менш виразними (табл. 1, 2). Тобто порушення вмісту ХС і ФЛ мало універсальний характер, а отримані дані повністю підтверджують раніше проведені дослідження, котрими доведено, що СТЗ-викликаний діабет суттєво дискоординує ліпідний обмін в експериментальних тварин.

Наступне завдання – вивчення коригувального впливу комплексної сполуки германію з ніотиною кислотою (МІГУ-4) та препарату-регулятора інсуліну на вміст ХС, ФЛ та їхнє молярне співвідношення в мембранах еритроцитів і мітохондрій печінки тварин. Результати показують, що окреме профілактично-курсове введення МІГУ-4 та інсуліну призводило до відновлення цих показників уже через один місяць після відтворення СТЗ-викликаного діабету (табл. 3).

Під дією МІГУ-4 вміст загального ХС у мембранах еритроцитів і мітохондрій печінки відповідно становив 4,80±0,09 ммоль/л проти 4,21±0,12 у контролі (p>0,05) і 4,28±0,11 ммоль/л проти 3,54±0,17 у контролі (p<0,05), тобто наближався до контрольних величин. На тлі застосування МІГУ-4 вміст загальних фосфоліпідів у мембранах еритроцитів і мітохондрій печінки відрізнявся від контролю відповідно на 19,6 і 15,0 % (p<0,05), а коефіцієнт ХС/ФЛ – на 41,1 і 42,0 % (p<0,05), тобто також відзначалось вірогідне відновлення цих показників. Практично аналогічна картина динаміки змін досліджуваних показників спостерігалась при окремому застосуванні актрапиду (табл. 3). Важливо також зазначити, що зіставлення цих результатів із даними, які зареєстровані при нелікованому ЦД, дає змогу зробити висновок: профілактично-лікувальне введення МІГУ-4 та препарату інсуліну запобігає негативному впливу СТЗ на ліпідний склад біомембран.

Під час сумісного введення МІГУ-4 та актрапиду виявлялась синергічна дія у відновленні в мембранах еритроцитів і мітохондрій печінки тварин вмісту загального ХС, загальних ФЛ та їхнє співвідношення, котрі практично через один місяць після відтворення СТЗ-діабету не відрізнялись від контрольних величин (табл. 3). Отже, доведено, що за допомогою цих сполук можливе відновлення ліпідного обміну при СТЗ-викликаному діабеті у тварин.

Інтенсифікація процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) при ЦД супроводжується передовсім значущими змінами складу та ступеня окиснення ФЛ, що врешті-решт призводить до порушення цілісності ліпідного бішару клітинних мембран і зменшенню активності фосфоліпідзалежних ферментних систем. Головна особливість ФЛ полягає в тому, що його «голівка» гідрофільна, а «хвости» гідрофобні, й перебуваючи в товщі водного середовища, вони утворюють бішар, тобто

**Таблиця 3.** Динаміка вмісту загального холестерину, загальних фосфоліпідів та їхнє молярне співвідношення в мембранах еритроцитів і мітохондрій печінки щурів при стрептозотозин-викликаною діабеті та його корекції (ммоль/л, n=9)

№ п/п	Умови експерименту	Матеріали дослідження	Статистичні показники	Загальний ХС	Загальні ФЛ	Співвідношення ХС/ФЛ
1	Контроль	еритроцити	M±m	4,21±0,12	4,95±0,16	0,85±0,04
			%	100,0	100,0	100,0
		мітохондрії	M±m	3,54±0,17	4,01±0,11	0,88±0,06
			%	100,0	100,0	100,0
2	Діабет без лікування (2 тижні)	еритроцити	M±m	5,68±0,13	3,49±0,09	1,62±0,08
			%	134,5*	70,5*	190,6*
		мітохондрії	M±m	4,63±0,19	3,11±0,09	1,48±0,07
			%	130,8*	77,5*	168,2*
3	Діабет + інсулін (1 міс. після СТЗ)	еритроцити	M±m	4,81±0,11	3,52±0,09	1,37±0,04
			%	114,2	71,1*	161,2*
		мітохондрії	M±m	4,30±0,12	3,37±0,10	1,23±0,05
			%	121,5*	84,0*	140,0*
4	Діабет + МІГУ-4 (1 міс. після СТЗ)	еритроцити	M±m	4,80±0,09	3,98±0,11	1,20±0,06
			%	114,0	80,4*	141,1*
		мітохондрії	M±m	4,28±0,11	3,41±0,09	1,25±0,04
			%	120,9*	85,0*	142,0*
5	Діабет + інсулін + МІГУ-4 (1 міс. після СТЗ)	еритроцити	M±m	4,45±0,11	4,75±0,10	0,93±0,02
			%	105,7	95,6	109,4
		мітохондрії	M±m	3,66±0,13	3,81±0,14	0,96±0,03
			%	103,4	95,0	109,0

\*: p &lt; 0,05 щодо контролю.

**Таблиця 4.** Динаміка вмісту фосфоліпідних фракцій у мембранах еритроцитів щурів при стрептозотозин-викликаною діабеті та його корекції (за ліпідним фосфором, мг/100 мл еритроцитів; n = 10)

№ п/п	Умови експерименту	Статистичні показники	Загальні фосфоліпіди	Фракції фосфоліпідів					
				ЛФХ	СФМ	ФХ	ФЕА	ФС	ФФК
1	Контроль	M±m	252,4±3,9	26,6±1,7	45,4±2,1	104,0±3,8	51,5±1,9	10,3±0,9	14,6±0,8
		%	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
2	Діабет без лікування (2 тижні)	M±m	143,3±2,5	39,7±2,1	56,3±2,7	27,22±1,7	12,9±0,8	4,3±0,3	2,9±0,2
		% (2–1)	56,8*	149,2*	124,0*	26,1*	25,0*	41,7*	19,9*
3	Діабет + інсулін (1 міс. після СТЗ)	M±m	169,1±1,8	36,6±1,4	51,1±1,7	39,8±1,2	28,6±1,0	7,4±0,7	5,6±0,4
		% (3–1)	67,0*	137,6*	112,5	38,3*	55,5*	71,8*	38,3*
		% (3–2)	118,0*	92,2	90,8	146,3*	221,7*	172,1*	193,1*
4	Діабет + МІГУ-4 (1 міс. після СТЗ)	M±m	178,9±2,1	37,4±1,7	50,1±1,9	45,2±1,6	32,6±1,2	7,6±0,6	6,0±0,5
		%(4–1)	70,9*	140,6*	110,3	43,5*	63,3*	73,8*	41,1*
		%(4–2)	124,8*	94,2	89,0	166,2*	252,7*	176,4*	206,9*
		%(4–3)	105,8	102,2	98,0	113,6	114,0	102,7	107,1
5	Діабет + інсулін + МІГУ-4 (1 міс. після СТЗ)	M±m	225,8±3,3	29,2±0,9	43,8±1,3	87,3±2,1	44,8±1,4	9,5±0,6	11,2±0,4
		% (5–1)	89,5	109,8	96,5	83,9*	87,0	92,2	76,7*
		% (5–2)	157,6*	73,5*	77,8*	321,0*	347,3*	220,9*	386,2*

\*: вірогідність (p &lt; 0,05).

подвійний шар фосфоліпідних молекул, де гідрофільна частина структури з обох сторін доторкається до води, а гідрофобні хвости заховані всередину бішару та в такий спосіб захищені від контакту з водою [3]. Це визначає різноманітність хімічних і фізичних властивостей ФЛ, у тому числі забезпечення функціонування ліпосом та ліпідного матриксу мембран.

Дослідження фосфоліпідного спектра мембран еритроцитів щурів показало, що при ЦД не тільки катастрофічно зменшувався вміст загальних ФЛ, але й відбувався перерозподіл їхніх окремих фракцій. В умовах активації вільнорадикальних процесів окиснення, що відбуваються на тлі розвитку ЦД, найсуттєвішим є зменшення кількості ФЛ, які містять у собі поліненасичені жирні кислоти – ФС, ФЕА, фосфатиділінозитол.

Встановили, що через 2 тижні після відтворення СТЗ-діабету вміст загальних ФЛ у мембранах еритроцитів (як стандартного об'єкта дослідження) зменшувався майже вдвічі (143,3±2,5 мг/100 мл еритроцитів проти 252,4±3,9 у контролі, p < 0,05). При цьому дійсно відбувалось зміщення співвідношення різних фракцій ФЛ (табл. 4).

Підвищувався вміст важкоокиснюваних ФЛ: ЛФХ – у 1,5 раза (39,7±2,1 мг/100 мл еритроцитів проти 26,6±1,7 у контролі, p < 0,05), СФМ – на 24,0% (56,3±2,7 мг/100 мл еритроцитів проти 45,4±2,1 у контролі, p < 0,05). Збільшення вмісту лізоформ ФЛ, наприклад, ЛФХ, є прямим доказом катаболічних і деструктивних процесів. Паралельно катастрофічно зменшувався (майже у 4,0 раза) вміст ФХ і ФЕА (відповідно 27,2±1,7 мг/100 мл еритро-

цитів проти  $104,0 \pm 3,8$  у контролі і  $12,9 \pm 0,8$  мг/100 мл еритроцитів проти  $51,5 \pm 1,9$  у контролі,  $p < 0,05$ ). Зменшення вмісту легкоокиснюваних домінуючих фракцій, якими є ФХ і ФЕА, свідчать про напруженість компенсаторних механізмів підтримки морфофункціонального гомеостазу мембран. Зменшення у 2,0 раза вмісту ФС ( $4,3 \pm 0,3$  мг/100 мл еритроцитів проти  $10,3 \pm 0,9$  у контролі,  $p < 0,05$ ) є ще одним підтвердженням пригнічення тканинного дихання, тобто порушення «плинності» клітинних мембран або деградації ліпідного бішару мембран. Підтвердженням, імовірно, розвитку такого механізму є зменшення майже в'ятеро вмісту ФФК ( $2,9 \pm 0,2$  мг/100 мл еритроцитів проти  $14,6 \pm 0,8$  у контролі,  $p < 0,05$ ), які є проміжними сполуками синтезу самих ФЛ.

Отже, при ЦД розвивається вибіркова дезліпідизація мембран, що призводить до зростання співвідношення ХС/ФЛ, змін фізико-хімічних властивостей мембран і зростання їхньої мікров'язкості.

Тому важливо оцінити профілактично-лікувальну дію МІГУ-4 та препарату-регулятора інсуліну на тлі експериментального ЦД на зміни співвідношення окремих фракцій ФЛ у клітинних мембранах. Введення окремо МІГУ-4 дещо зменшувало негативний вплив СТЗ-викликаного ЦД на спектр ФЛ у мембранах еритроцитів (табл. 4). Аналогічна за спрямуванням і виразністю дія реєструвалась при застосуванні одного актрапиду.

Сумісне введення МІГУ-4 та інсуліну суттєво запобігало змінам дискоординації пулу окремих фракцій ФЛ, що викликані СТЗ ЦД (табл. 4). Так, якщо відсоток ЛФХ у мембранах еритроцитів тварин через два тижні довільного відновлення становив 149,2% від контролю, то при введенні МІГУ-4 та інсуліну вже через один місяць він становив 109,8% ( $p > 0,05$ ). Під дією МІГУ-4 та інсуліну відновлювався до рівня контролю відсоток й інших фракцій ФЛ: СФМ – 96,5% ( $p > 0,05$ ), ФХ – 83,9 ( $p < 0,05$ ), ФС – 92,2 ( $p > 0,05$ ), ФЕА – 87,0 ( $p > 0,05$ ), ФФК – 76,6% ( $p < 0,05$ ).

Отже, сумісне профілактично-лікувальне введення МІГУ-4 та інсуліну вірогідно запобігало змінам вмісту загальних ФЛ і співвідношенню їхніх окремих фракцій, загального ХС і ХС/ФЛ, тобто запобігало деструктивним змінам мембран еритроцитів.

Очевидним є і те, що цікаво було б порівняти результати, котрі одержали, з вивченням стану ПОЛ та антирадикального захисту при формуванні експериментального ЦД і його корекції цими сполуками. Ці результати аналізуються та будуть опубліковані в наступних роботах.

## Висновки

1. Дослідження свідчать про те, що стрептозоточинний цукровий діабет суттєво впливає на обмін ліпідів в організмі.

2. Суть цих змін полягає в тому, що на тлі цукрового діабету достеменно збільшується вміст загального холестерину й зменшується вміст загальних фосфоліпідів у мембранах еритроцитів та мітохондрій печінки щурів, що призводить до суттєвого зростання коефіцієнта їхнього молярного співвідношення (холестерин/фосфоліпід)

3. Зарєстровані зміни наростали й досягали максимальних величин на другому місяці спостереження, коли вміст загального холестерину вірогідно збільшувався більш ніж у 2,0 раза, а загальних фосфоліпідів у 2,0 раза

зменшувався. При цьому коефіцієнт їхнього співвідношення збільшувався більш ніж у 3,5 раза, що є прямим доказом дискоординації ліпідного обміну в біомембранах.

4. Ці зміни залишались такими протягом 6 місяців спостереження з тенденцією до деякого поліпшення. Порівнюючи зміни вмісту холестерину та фосфоліпідів у мембранах мітохондрій печінки з аналогічними показниками в мембранах еритроцитів тварин, слід відзначити, що вони мали односпрямований характер.

5. Доведено, що ніацин-оксіетилідендифосфонатогерманат і препарат інсуліну, які введені поодиночі, сприяли нормалізації вмісту загальних холестерину, фосфоліпідів та їхнього молярного співвідношення, а їхнє сумісне застосування відновлювало ці показники до величин контролю.

6. Поряд зі збільшенням вмісту холестерину та зменшенням вмісту фосфоліпідів при експериментальному діабеті відбувався зсув спектра різних фракцій фосфоліпідів. Підвищувався вміст фракцій важкоокиснених фосфоліпідів (лізофосфатидилхоліну та сфінгомеліну) при катастрофічному зменшенні легкоокиснюваних (фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін), що свідчить про напруженість компенсаторних механізмів підтримки стабільної «плинності» мембран.

7. Профілактично-лікувальне введення препарату інсуліну дещо зменшувало негативний вплив стрептозоточину на спектр фосфоліпідів. Аналогічну за спрямованістю та виразністю дію проявив також ніацин-оксіетилідендифосфонатогерманат (МІГУ-4). Сумісне їхнє введення дійсно запобігало дискоординації вмісту різних фракцій фосфоліпідів у мембранах еритроцитів і мітохондрій печінки тварин при експериментальному цукровому діабеті.

**Перспективи подальших досліджень.** Надалі важливим завданням є вивчення та зіставлення стану перекисного окиснення ліпідів та антирадикального захисту з порушенням ліпідного обміну при експериментальному цукровому діабеті.

## Список літератури

- [1] Кресюн Н.В. Стан мембран мітохондрій печінки щурів при експериментальному діабеті та медикаментозної корекції / Н.В. Кресюн, Г.О. Сон, Л.С. Годлевський // Одеський медичний журнал. – 2017. – №1. – С. 5–12.
- [2] Структурно-функціональна характеристика мембран еритроцитів і її змінення при патології різного генеза / М.К. Боровская, Э.Э. Кузнецова, В.Г. Горихова и др.] // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2010. – №3(73). – С. 334–354.
- [3] Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии / под ред. К. Уилсон, Дж. Уолкер. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2015. – 848 с.
- [4] Аблаев Н.Р. Молекулярные механизмы развития сахарного диабета при дефиците витамина Д и хрома (обзор современной литературы) / Н.Р. Аблаев, Д.Ж. Батырбаева // Вестник КАЗНМУ. – 2015. – №3. – С. 186–197.
- [5] Корженевский Д.А. Подход к идентификации молекулярных фракций фосфолипидов человека методом ВЭЖЛХ с масс-спектрофотометрическим детектированием / Д.А. Корженевский, А.А. Селищева, С.В. Савельев // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56. – Вып. 6. – С. 747–757.
- [6] Скрипник И.Н. Эссенциальные фосфолипиды в лечении и профилактике медикаментозных поражений печени / И.Н. Скрипник // Современная гастроэнтерология. – 2009. – №4(48). – С. 22–31.
- [7] Хохлов О.А. Структура липидной фазы мембраны эритроцитов у больных с выраженным гемолизом после операций с искусственным кровообращением / О.А. Хохлов // Бюллетень сибирской медицины. – 2013. – Т. 12. – №1. – С. 75–79.

- [8] Elongation index of erythrocytes, study of activity of chosen erythrocyte enzymes, and the levels of glutathione, malonyldialdehyde in polycythemia vera (PV). / Z. Dabrowsky, A. J. Dybowicz, A. Marchewska et al. // *Clin. Hemorheol Microcirc.* – 2010. – Vol. 47(3). – P. 169–176.
- [9] Pradelli L. A. Mitochondrial control of caspase-dependent and independent cell death / L. A. Pradelli, M. Beneteau, J. E. Ricci // *Cell. Mol. Life sci.* – 2010. – Vol. 67(10). – P. 1589–1597.
- [10] Можейко Л. А. Экспериментальные модели для изучения сахарного диабета. Часть II. Хирургический, стрептозототиновый и дитизоновый диабет / Л. А. Можейко // *Журнал Гродненского государственного медицинского университета.* – 2013. – №4(44). – С. 005–010.
- [11] Методы клинических лабораторных исследований / под ред. проф. В. С. Камышникова. – 8-е изд. – М.: МЕДпресс-информ, 2016. – 736 с.
- [12] Тонкослойная хроматография липидов / Т. А. Веселова, А. П. Веселов, А. В. Дерюгина. – Н. Новгород: ННГУ, 2015. – 23 с.

## References

- [1] Kresyun, N. V., Son, H. O., & Hodlevskiy, L. S. (2017) Stan membran mitochondrii pechinky shchuriv pry eksperymentalnomu diabeti ta medykamentoznoi korektsii [State of mitochondrial membrane of rat's liver in experimental diabetes and pharmacological treatment]. *Odeskyi medychnyi zhurnal*, 1, 5–12. [in Ukrainian].
- [2] Borovskaya, M. K., Kuznetsov, E. E., Gorokhova, V. G., Koriakina, L. B., Kuril'skaya, T. E., & Pivovarov, Ju. I. (2010) Strukturno funktsionalnaya kharakteristika membran e'ritrocytov i yeyo izmeneniya pri patologii raznogo geneza [Structural and functional characteristics of membrane's erythrocyte and its change at pathologies of various genesis]. *Bjulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo centra Sibirskogo otdeleniya Rossijskoj akademii medicinskikh nauk*, 3(73), 334–354. [in Russian].
- [3] Wilson, K., & Walker, J. (2015) *Principy i metody biokhimi i molekulyarnoj biologii [Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology]*. Moscow: Binom. Laboratoriya znanij. [in Russian].
- [4] Ablaev N. R., & Batorybaeva, D. Zh. (2015) Molekulyarnyye mekhanizmy ravitiya sakharnogo diabeta pri deficite vitamina D i khroma (obzor sovremennoj literatury) [Molecular mechanisms of the development of diabetes under conditions of vitamin D and chrom deficit (review)]. *Vestnik KAZNMU*, 3, 186–197. [in Russian].
- [5] Korzhenevskij, D. A., Selischeva, A. A., & Savel'ev, S. V. (2010) Podkhod k identifikatsii molekulyarnykh fraktsij fosfolipidov cheloveka metodom VE'ZHLKH s mass-spektrifotometricheskimi detektirovaniem [The approach to identification of human molecular phospholipid fractions via exploration of HPLC combined with mass-spectrophotometry detection]. *Biomedicinskaya khimiya*, 56(6), 747–757. [in Russian].
- [6] Skrypnik, I. N. (2009) E'ssencial'nye fosfolipidy v lechenii i profilaktike medykamentoznykh porazhenij pecheni [Essential phospholipids in the treatment and prophylaxis of medicinal liver lesions]. *Suchasna gastroenterologiya*, 4(48), 22–31. [in Ukrainian].
- [7] Khokhlov, O. A. (2013) Struktura lipidnoj fazy membrany e'ritrocytov u bol'nykh s vyrazhennym gemolizom posle operatsii s isskusstvennym krovoobrashcheniem [The structure of the lipid phase of the erythrocyte membrane in patients with expressed hemolysis after surgery with cardiopulmonary bypass]. *Bjulleten' sibirskoj medicyny*, 12(1), 75–79. doi: <http://dx.doi.org/10.20538/1682-0363-2013-1-75-79>. [in Russian].
- [8] Dabrowsky, Z., Dybowicz, A. J., Marchewska, A., Teleglów, A., Skotnicki, A., Zdunczyk, A., et al. (2010) Elongation index of erythrocytes, study of activity of chosen erythrocyte enzymes, and the levels of glutathione, malonyldialdehyde in polycythemia vera (PV). *Clin. Hemorheol Microcirc.*, 47(3), 169–176.
- [9] Pradelli, L. A., Beneteau, M., & Ricci, J. E. (2010) Mitochondrial control of caspase-dependent and independent cell death. *Cell. Mol. Life sci.*, 67(10), 1589–1597. doi: [10.1007/s00018-010-0285-y](https://doi.org/10.1007/s00018-010-0285-y).
- [10] Mozheyko, L. A. (2013) E'ksperimentalnye modeli dlya izucheniya sakharnogo diabeta. Chast' II. Khirurgicheskij, streptozotocinovyy i ditzonovyy diabet [Experimental models for studying diabetes mellitus Part II surgically, streptozotocin and dithione-induced diabetes]. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*, 4(44), 005–010. [in Russian].
- [11] Kamyshnikov, V. S. (2016) *Metody klinicheskikh laboratornykh issledovanij [Methods of clinical laboratory investigations]*. V. S. Kamyshnikov (Ed). Moscow. [in Russian].
- [12] Veselova, T. A., Veselov, A. P., & Deryugina, A. V. (2015) *Tonkoslojnaya khromatografiya lipidov [Thin-layer lipid chromatography]*. Nizhnij Novgorod. [in Russian].

Годован В. В., д-р мед. наук, профессор каф. загальної та клінічної фармакології, Одеський національний медичний університет, Україна.

Годлевський Л. С., д-р мед. наук, професор, зав. каф. біофізики, інформатики та медичної апаратури, Одеський національний медичний університет, Україна.

## Сведения об авторах:

Кресюн Н. В., д-р мед. наук, профессор каф. офтальмологии, Одесский национальный медицинский университет, Украина. Сон А. А., аспирант каф. общей и клинической фармакологии, Одесский национальный медицинский университет, Украина.

Годован В. В., д-р мед. наук, профессор каф. общей и клинической фармакологии, Одесский национальный медицинский университет, Украина.

Годлевский Л. С., д-р мед. наук, профессор, зав. каф. биофизики, информатики и медицинской аппаратуры, Одесский национальный медицинский университет, Украина.

## Information about authors:

Kresyun N. V., MD, PhD, DSci, Professor, Department of Ophthalmology, Odesa National Medical University, Ukraine.

Son A. A., Post-graduate, Department of General and Clinical Pharmacology, Odesa National Medical University, Ukraine.

Godovan V. V., MD, PhD, DSci, Professor, Department of General and Clinical Pharmacology, Odesa National Medical University, Ukraine.

Godlevsky L. S., MD, PhD, DSci, Prof., Head of the Department of Biophysics, Information Science and Modern Technologies, Odesa National Medical University, Ukraine.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

**Conflicts of Interest:** authors have no conflict of interest to declare.

Надійшло до редакції / Received: 04.04.2017

Після доопрацювання / Revised: 15.05.2017

Прийнято до друку / Accepted: 25.05.2017

## Відомості про авторів:

Кресюн Н. В., д-р мед. наук, професор каф. офтальмології, Одеський національний медичний університет, Україна.

Сон Г. О., аспірант каф. загальної та клінічної фармакології, Одеський національний медичний університет, Україна.