

УДК 616.379-008.64: 57.084.1

DOI 10.5281/ZENODO.20795666

ИЗМЕНЕНИЕ КОЖНОЙ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ И ТКАНЕВОГО МЕТАБОЛИЗМА ПРИ РАЗВИТИИ АЛЛОКСАН-ИНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА У КРЫС

Чуян Е. Н., Муртазаева А. М., Ливенцов С. Ю.

*Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», Симферополь,
Республика Крым, Россия
E-mail: elena-chuyan@rambler.ru*

Проведено исследование изменений кожной микроциркуляции и тканевого метаболизма на модели аллоксан-индуцированного диабета у крыс. Показано, что аллоксан-индуцированный диабет у крыс сопровождается выраженными и прогрессирующими нарушениями кожной микроциркуляции и тканевого метаболизма, характеризующимися вазоконстрикцией микрососудов, гипертензией, нарушениями окислительно-восстановительного баланса. Полученные результаты расширяют представление о патогенезе сосудистых осложнений (диабетических макро- и микроангиопатий) при сахарном диабете 1 типа и обосновывают необходимость комплексной оценки микроциркуляторных и метаболических нарушений.

Ключевые слова: сахарный диабет 1 типа, аллоксан-индуцированный диабет, вазоактивное действие, тканевая микроциркуляция, тканевый метаболизм, сосудистый тонус, вазоконстрикция, артериальное давление.

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет (СД) относится к числу наиболее приоритетных медико-социальных проблем современного здравоохранения. Это обусловлено его высокой распространённостью и хроническим неуклонно прогрессирующим течением, а также развитием тяжёлых, зачастую необратимых осложнений, которые приводят к ранней инвалидизации и смерти пациентов. Патогенетической основой СД выступает дефицит инсулина: абсолютный – при СД 1 типа (СД1, вследствие аутоиммунной деструкции β -клеток) и относительный – при СД 2 типа [1, 2]. Клиническая манифестация заболевания напрямую связана с синдромом хронической гипергликемии, возникающей из-за нарушения углеводного обмена [3]. По мере прогрессирования диабета гипергликемия инициирует каскад системных метаболических расстройств, поражая различные органы и ткани. При этом наибольшей угрозой для пациентов признаны осложнения со стороны сердечно-сосудистой системы и почек.

При СД1 центральным звеном патогенеза выступает стойкая гипергликемия, которая запускает цепь взаимосвязанных патофизиологических реакций (полиоловый

путь, образование конечных продуктов гликозилирования, активация протеинкиназы С) [4]. Эти изменения закономерно приводят к специфическим сосудистым осложнениям. Важно подчеркнуть, что уже на ранних стадиях заболевания, задолго до развёрнутой клинической картины поздних осложнений, формируются функциональные нарушения микроциркуляции (МЦ) [5]. Именно расстройства микрогемодинамики лежат в основе таких серьёзных проявлений диабета, как диабетическая стопа, ангиопатия, ретинопатия и нейропатия [6]. Данные состояния не только значительно снижают качество жизни, но и нередко служат прямой причиной инвалидизации пациентов трудоспособного возраста [7].

В связи с этим раннее выявление изменений микроциркуляции приобретает ключевое, прогностическое значение. Своевременная диагностика сосудистой дисфункции на доклинической стадии позволяет предотвратить или существенно отсрочить развитие необратимых осложнений [5]. Удобным и клинически оправданным объектом для неинвазивной оценки функции микрососудов служит кожа. Обнаруживаемая при этом кожная микрососудистая дисфункция рассматривается в современной литературе как надёжный маркер системного поражения организма.

Особого внимания заслуживает тот факт, что микроциркуляторные расстройства при диабете развиваются не изолированно, а в тесной и взаимноотягощающей связи с изменениями тканевого метаболизма (ТМ). Хроническая гипергликемия запускает каскад метаболических сдвигов, включающий нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза, избыточное накопление восстановленных пиридиннуклеотидов (НАДН) и угнетение активности флавиновых коферментов (ФАД) [8]. Указанные процессы, в свою очередь, усугубляют эндотелиальную дисфункцию, повышают сосудистый тонус, способствуют агрегации форменных элементов крови и, в конечном итоге, приводят к стойкому снижению перфузии тканей. Таким образом, метаболические сдвиги повреждают микроциркуляцию, а ухудшение перфузии дополнительно нарушает тканевой метаболизм.

В связи с этим, *целью исследования* явилось выявление изменений показателей кожной микроциркуляции и тканевого метаболизма у крыс на модели аллоксан-индуцированного диабета.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальную часть настоящего исследования выполняли в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная физиология и биофизика» кафедры физиологии человека и животных и биофизики Института биохимических технологий, экологии и фармации ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского».

Лабораторные крысы содержались в виварии в условиях стандартного светового режима при температуре 18–22 °С. Использовали подстил «Рехофикс МК 2000» на основе кукурузных початков (ООО «Зилубаг», Россия). Животным был обеспечен свободный доступ к воде и полноценному гранулированному корму ЛБК-120 (ЗАО «Тосненский комбикормовый завод», Россия). Все процедуры с

животными соответствовали требованиям ГОСТ Р 53434-2009, ГОСТ 33215-2014, правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований, этическим стандартам, утвержденным правовыми актами Российской Федерации, ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными, правилам оборудования помещений и организации процедур», рекомендациям Комиссии по биоэтике ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского».

В исследование включались половозрелые самцы крыс (n=35) линии *Wistar* (ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово») без внешних признаков заболеваний, физических отклонений и травм массой 240–290 г., характеризующихся средней двигательной активностью и низкой эмоциональной реакцией при исследовании в тесте «открытое поле» (IR Actimeter, Pan Lab Harvard Apparatus с программным обеспечением Actitrack 2 (Pan Lab Harvard Apparatus, Испания).

Экспериментальные животные демонстрировали признаки здорового состояния, никогда ранее не участвовали в исследованиях, прошли карантин продолжительностью не менее 14 дней и адаптацию к условиям эксперимента, рукам исследователя (хэндлинг) и экспериментальным манипуляциям, а именно процедурам регистрации показателей артериального давления (АД), кожной МЦ и ТМ.

Дизайн эксперимента. Отобранных для эксперимента животных случайным образом («методом конвертов») разделили на 2 группы: 1 (n=10) – контрольная; 2 (n=25) – экспериментальная с аллоксан-индуцированным диабетом, который создавали парентеральным введением раствора аллоксан-моногидрата ($C_4H_2N_2O_4 \cdot H_2O$; производитель – «Диаэм», Россия) Препарат вводили внутривентрально по 100 мг/кг в физиологическом растворе (0,2 мл) трижды с интервалом в 24 часа, что обеспечивало суммарную диабетогенную дозу 300 мг/кг [9, 10]. Животные 1 контрольной группы (n=10) получали эквивалентный объем физиологического раствора (0,2 мл) в те же сроки (рис. 1).

На 1, 18, 35 и 49 сутки экспериментального исследования, т. е. до (1 сутки) и на 14, 31, 45 сутки после введения суммарной диабетогенной дозы аллоксана у всех животных регистрировали систолическое (САД, мм рт. ст.) и диастолическое (ДАД, мм рт. ст.) АД (NIBP200A «Biorac Systems, Inc.», США с программным обеспечением «AcqKnowledge 4.2 for MP150»); показатели МЦ и ТМ.

Показатели МЦ определяли методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) с помощью лазерного анализатора кровотока «ЛАЗМА-МЦ» (производство НПП «Лазма», Россия). Для исключения движений во время диагностики исследуемое животное помещали в пенал (AE1001-R0, НПК «Открытая Наука», Россия), размер которого подбирали так, чтобы животное могло свободно дышать, и ни одна часть тела не была плотно зажата. Показатели МЦ снимали с основания хвоста, лишенного плотного волосяного покрова, который фиксировали на ровной поверхности на одной линии с телом в горизонтальном положении тканевым пластырем. Оптоволоконный зонд прибора «ЛАЗМА-МЦ-1» крепили у основания хвоста крысы перпендикулярно с помощью тканевого пластыря.

В ходе исследования оценивали неосцилляторные показатели: показатель микроциркуляции (ПМ, перф. ед.); среднее квадратичное отклонение (СКО, перф. ед.); коэффициент вариации (Кв, %), осцилляторные показатели: нормированные амплитуды колебаний эндотелиального (Аэ), миогенного (Ам), нейрогенного (Ан), дыхательного (Ад) и сердечного (Ас) ритмов, значения которых рассчитывали с помощью компьютерной программы обработки ЛДФ-граммы LDF 2.20.0.507WL. Амплитудно-частотные характеристики осцилляций кожного кровотока у крыс имеют определенные особенности [11]. Методика исследования и анализа показателей кожной МЦ у крыс подробно описана в нашей работе [12].

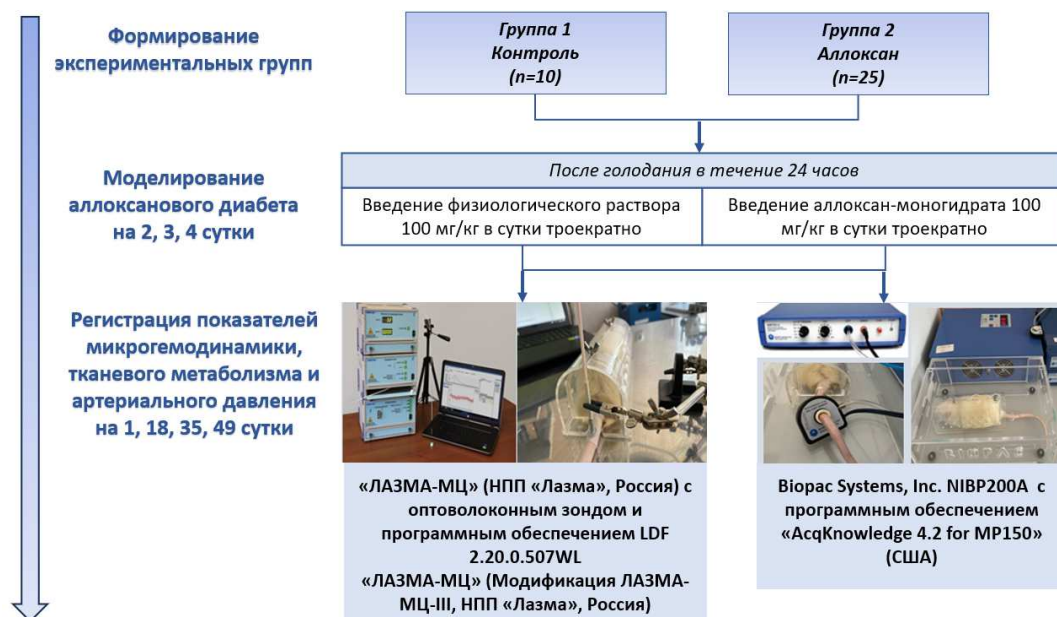


Рис. 1. Дизайн экспериментального исследования.

Примечание: контроль – контрольная группа крыс; аллоксан – группа крыс с аллоксан-индуцированным диабетом; n – количество крыс.

Ввиду вариабельности значений амплитуд (А, перф. ед.) колебаний анализируемых ритмов, используются их нормированные величины (А_{норм}, перф. ед.), что дает возможность исключить влияние посторонних факторов на проведение исследований и сравнивать величины амплитуд у разных животных:

$$A_{\text{норм}} = A / 3\text{СКО}, \quad (1)$$

где А – амплитуда колебаний скорости кровотока анализируемого ритма; СКО – среднеквадратическое отклонение амплитуды скорости кровотока от среднего арифметического значения.

Использование программы LDF 2.20.0.507WL дает возможность автоматически рассчитывать нормированные амплитуды колебаний скорости кровотока для каждого диапазона частот.

Рассчитывали показатели нейрогенного (НТ) и миогенного (МТ) тонусов [13, 14]:

$$НТ = СКО \cdot А_{Дср} / А_n \cdot ПМ, \quad (2)$$

где СКО – среднее квадратичное отклонение показателя микроциркуляции, $A_{Дср}$ – среднее артериальное давление, A_n – значение амплитуды колебаний перфузии в нейрогенном диапазоне.

$$МТ = СКО \cdot А_{Дср} / А_m \cdot ПМ, \quad (3)$$

где A_m – значение амплитуды колебаний перфузии в миогенном диапазоне.

Среднее артериальное давление у животных ($A_{Дср}$, мм рт. ст.) рассчитывали по формуле:

$$А_{Дср} = ДАД + 1/3(САД - ДАД), \quad (4)$$

где ДАД – диастолическое артериальное давление, САД – систолическое артериальное давление.

Сумму максимальных амплитуд (A_{max}) в эндотелиальном, нейрогенном, миогенном и сердечном частотных диапазонах расценивали как мощность механизмов, обеспечивающих приток крови в микроциркуляторное русло по формуле:

$$\Sigma A_{max} = A_{\Sigma} + A_n + A_m + A_c, \quad (5)$$

где A_{Σ} – значение амплитуды колебаний перфузии в эндотелиальном диапазоне; A_c – значение амплитуды колебаний перфузии в сердечном диапазоне.

Рассчитывали соотношение притока крови к венозному оттоку, поскольку изменение A_d обусловлено периодическими колебаниями в венозном отделе МЦ:

$$C = \Sigma A / A_d, \quad (6)$$

где A_d – значение амплитуды колебаний перфузии в дыхательном диапазоне.

Для диагностики состояния ТМ у крыс использовали метод лазерной флуоресцентной спектроскопии (ЛФС) с помощью лазерного анализатора кровотока «ЛАЗМА-МЦ» (модификация ЛАЗМА-МЦ-III, производство НПП «Лазма», Россия), позволяющий исследовать изменения флуоресценции восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) и окисленного флавинадениндинуклеотида (ФАД) [13].

Для расчёта редокс-соотношения (РО), отражающего окислительно-восстановительное соотношение в митохондриальном матриксе, использовали формулу:

$$PO = (If \text{ NADH} / If \text{ FAD}) \times (II \text{ FAD} / II \text{ NADH}), \quad (7)$$

где $If \text{ NADH}$ и $If \text{ FAD}$ – амплитуды флуоресценции коферментов НАДН и ФАД; $II \text{ FAD}$, $II \text{ NADH}$ – амплитуды возбуждения флуоресценции коферментов ФАД и НАДН.

Статистическую и графическую обработку экспериментальных данных осуществляли с помощью программ Graph Pad Prism 8 и «Microsoft Excel 2007». Поскольку распределение данных не соответствовало нормальному (критерий Шапиро-Уилка), значимость различий между группами оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считались достоверными при $p < 0,05$. Данные на рисунках и в тексте представлены в виде медианы и нижнего и верхнего квартилей (Me (Q25:Q75)), а также в процентах, рассчитанных относительно значений контрольной группы, принятых за 100 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты исследования, у животных у 1 группы (контрольной) во все сроки наблюдения, а у 2 группы до введения аллоксана значения исследуемых показателей АД, МЦ и ТМ были в пределах физиологической нормы и согласуются с результатами наших предыдущих исследований [12, 15, 16].

На 18, 35, 49 сутки исследования после введения диабетогенной суммарной дозы аллоксана наблюдалось статистически значимое повышение значений САД на 3,28 % ($p=0,004$), 4,35 % ($p=0,009$), 2,76 % ($p=0,037$) и ДАД на 12,39 % ($p<0,001$), 5,16 % ($p=0,011$), 8,81 % ($p=0,046$) соответственно относительно показателей контрольной группы животных (рис. 2).

При СД часто наблюдается гипертензивная реакция, что значительно увеличивает риск сердечно-сосудистых и почечных осложнений. Указанные гемодинамические сдвиги, вероятно, связаны с активацией симпатической нервной системы, задержкой натрия и воды, а также с повышением жёсткости сосудистой стенки, что является характерным проявлением диабетической макроангиопатии и создаёт дополнительную нагрузку на микроциркуляторное русло (МЦР) [17–19].

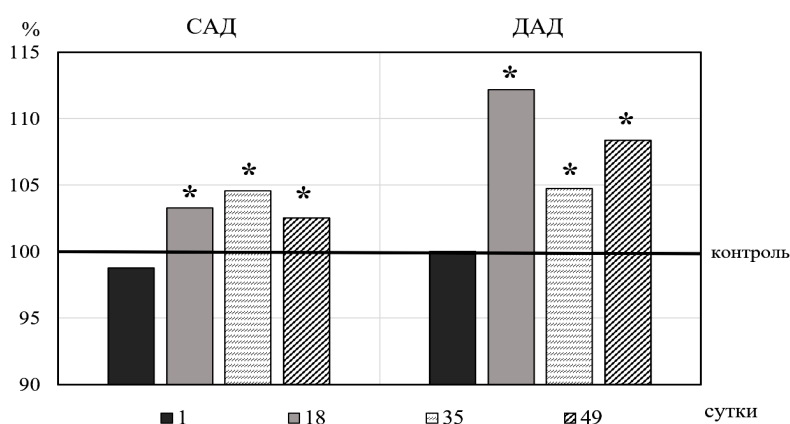


Рис. 2. Динамика показателей систолического (САД) и диастолического (ДАД) артериального давления у крыс с аллоксан-индуцированным диабетом в разные сроки эксперимента относительно значений в контрольной группе животных, принятых за 100 %.

Примечание: * – статистически значимое отличие по критерию Манна-Уитни относительно значений показателей у крыс контрольной группы.

После формирования аллоксан-индуцированного диабета у крыс 2 группы произошли и существенные изменения кожной МЦ. Так, на 18, 35, 49 сутки экспериментального исследования наблюдали статистически значимое снижение значения амплитуд эндотелиального ритма (Аэ) на 50,00 % ($p<0,001$), 68,24 % ($p=0,017$) и 48,72 % ($p=0,015$) относительно значений показателя у крыс контрольной группы (рис. 3).

Эндотелиальные колебания локализуются преимущественно в артериолах, где сосудистый эндотелий является активно секретирующим органом, обеспечивающим

непрерывное высвобождение основного гуморального вазодилататора оксида азота (NO) при участии NO-синтазы, который играет ключевую роль в поддержании сосудистого тонуса и регуляции кровотока. Эндотелиальный NO-зависимый (около 0,01 Гц) диапазон флуктуаций обусловлен именно периодическими изменениями концентрации NO [13, 14, 20, 21].

Таким образом, снижение Аз у крыс с аллоксановым диабетом свидетельствует об угнетении базальной секреции NO, что закономерно вызывает вазоконстрикторную реакцию.

Подтверждением этому является и изменение в ЛДФ-граммах крыс 2 группы амплитуд колебаний эндотелиально-независимого происхождения. Так, на 18, 35, 49 сутки у крыс экспериментальной группы значения амплитуды нейрогенных ритмов (Ан) достоверно снизились на 53,20 % ($p < 0,001$), 66,15 % ($p = 0,017$), 51,25 % ($p = 0,016$; рис. 3), что сопровождалось статистически значимым повышением НТ на 108,67 % ($p = 0,036$), 128,17 % ($p = 0,017$), 43,88 % ($p = 0,042$; рис. 4).

Нейрогенные колебания локализуются в артериолах и артериолярных сегментах артериоло-венулярных анастомозов, т. е. сосудах, иннервируемых симпатическими адренергическими волокнами, отражают активность со стороны симпатических адренергических нервных волокон на гладкомышечные стенки микрососудов и характеризуют уровень нутритивного кровотока. Выявленные изменения ЛДФ-граммы свидетельствуют об усилении вазоконстрикторного контроля артериолярного тонуса симпатическими нервами, повышении периферического сопротивления и снижении циркуляции крови по артериоло-венулярным шунтам [21].

На 18, 35 и 49 сутки у крыс экспериментальной группы зарегистрировано снижение амплитуд миогенного ритма (Ам), которые регистрируются на уровне проксимальных артериол, прекапиллярных сфинктеров и обусловлены периодической активностью гладкомышечных волокон артериол, приводя к изменению диаметра их просвета (вазомоции), а также коррелируют с числом функционирующих капилляров [13, 14, 21], на 58,85 % ($p < 0,001$), 71,28 % ($p = 0,017$) и 49,48 % ($p = 0,017$), что сопровождалось достоверным повышением значений МТ на 188,46 % ($p = 0,036$), 253,98 % ($p = 0,011$) и 32,88 % ($p = 0,042$) соответственно по отношению к значениям в контрольной группе животных, что свидетельствует о констрикции метартериол и прекапиллярных сфинктеров, которые в коже выполняют распределительную функцию и вносят максимальный вклад в формирование внутрисосудистого сопротивления на микроциркуляторном уровне.

Таким образом, снижение выработки NO в эндотелии, усиление симпатических адренергических влияний на гладкую мускулатуру, уменьшение числа функционирующих капилляров, повышение внутрисосудистого сопротивления в МЦР свидетельствуют о развитии вазоконстрикции микрососудов при аллоксан-индуцированном диабете.

На 18, 35 и 49 сутки экспериментального исследования зафиксировано снижение амплитуд сердечного ритма (Ас) на 62,19 % ($p < 0,001$), 41,46 % ($p = 0,017$) и 59,17 % ($p = 0,016$; рис. 3).

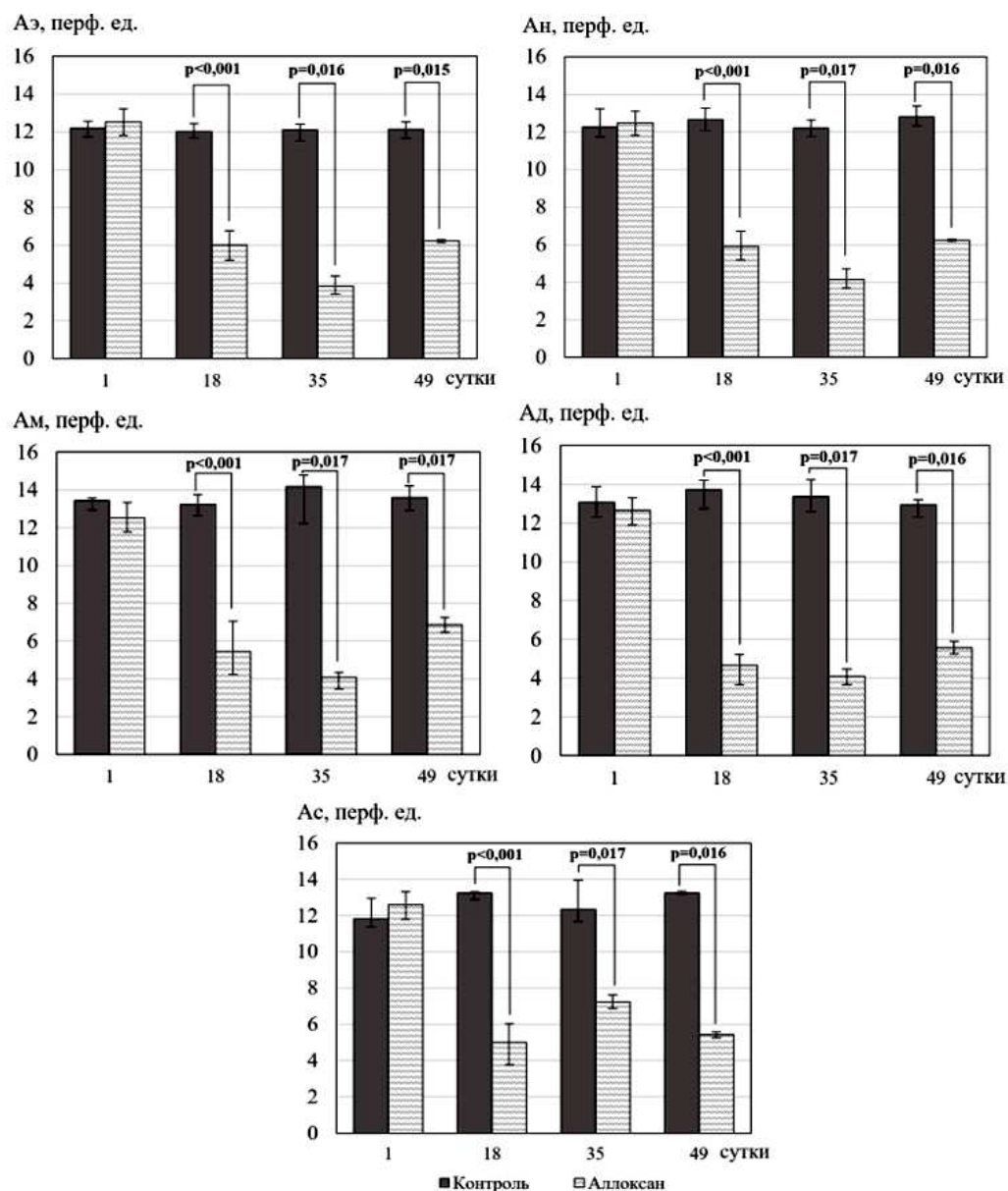


Рис. 3. Динамика амплитуд эндотелиальных (Аэ), нейрогенных (Ан), миогенных (Ам), дыхательных (Ад), сердечных (Ас) колебаний у крыс контрольной (Контроль) и экспериментальной групп с аллоксан-индуцированным диабетом (Аллоксан) в разные сроки эксперимента (1, 18, 35, 49 сутки).

Примечание: значения представлены в виде медианы и квартилей (Q1 – нижняя граница и Q3 – верхняя граница межквартильного диапазона); p – статистически значимое отличие по критерию Манна-Уитни относительно значений показателей у крыс контрольной группы.

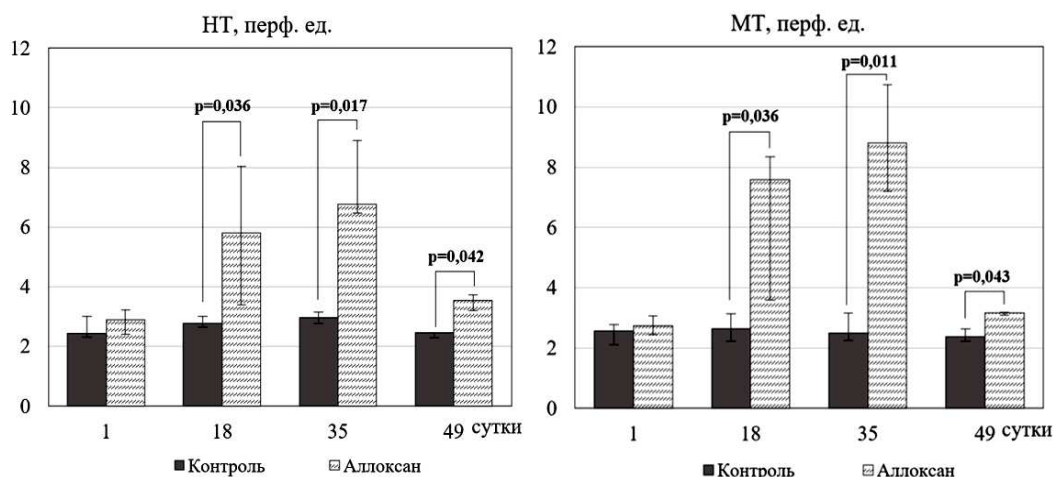


Рис. 4. Динамика нейрогенного (НТ) и миогенного (МТ) компонентов тонуса у крыс контрольной (Контроль) и экспериментальной групп с аллоксан-индуцированным диабетом (Аллоксан) в разные сроки эксперимента (1, 18, 35, 49 сутки).

Примечание: те же, что на рис. 3.

Сердечные волны ЛДФ-граммы локализуются в артериолах и капиллярах и отражают перфузионное давление в микрососудах, обусловленное сердечным выбросом, и состоянием тонуса сосудов, обеспечивающих сопротивление артериальному притоку крови [13, 14], а снижение их амплитуд указывает на уменьшение притока крови в МЦР у крыс с аллоксан-индуцированным диабетом.

Значения амплитуд дыхательного ритма (Ад) достоверно снизились на 18, 35 и 49 суткам на 66,06 % ($p < 0,001$), 69,44 % ($p = 0,017$) и 57,02 % ($p = 0,016$) соответственно у крыс экспериментальной группы.

Дыхательные колебания локализуются в венулах и венозном отделе МЦР и представляют собой модуляцию кровотока, обусловленную трансмиссией колебаний внутригрудного давления и влиянием дыхания на вегетативную регуляцию сердечного ритма [22, 23]. Происхождение дыхательных волн объясняется пассивной механической трансмиссией колебаний внутригрудного давления и центральным вегетативным взаимодействием дыхательного и сосудодвигательного центров.

Таким образом, снижение Ад в совокупности с изменениями ранее упомянутых механизмов свидетельствует об уменьшении дыхательной модуляции венозного кровотока и, как следствие – затрудненном венолярном оттоке крови.

Снижение мощности эндотелиального, нейрогенного, миогенного и сердечного механизмов регуляции, обеспечивающих приток крови в МЦР, привело к уменьшению суммарного притока крови (ΣA) у крыс экспериментальной группы на 18, 35 и 49 сутки на 53,03 % ($p < 0,001$), 60,62 % ($p = 0,017$) и 51,66 % ($p = 0,017$; рис. 5) соответственно.

Одновременно зафиксировано достоверное повышение соотношения $\Sigma A/A_d$ на 18 и 35 сутки на 36,87 % ($p<0,001$) и 31,66 % ($p=0,030$). Данное соотношение отражает дисбаланс между артериальным притоком и веноулярным оттоком крови [13, 14], его повышение указывает на то, что при сниженном объёме притекающей крови её отток из МЦР оказывается затруднённым. Это состояние является прямым следствием вазоконстрикции, охватывающей приносящие артериолы, прекапиллярные сфинктеры, что уменьшает приток крови в капилляры, так и вены, что увеличивает сопротивление оттоку крови из МЦР. В результате уменьшается просвет артериол и артериоло-веноулярных анастомозов, возрастает посткапиллярное сопротивление, и микроциркуляторное давление повышается [13, 16]. Выраженное нарушение венозного оттока способствует усугублению микроциркуляторной дисфункции и повышению гидростатического давления, отёку тканей и дальнейшему снижению перфузионного градиента.

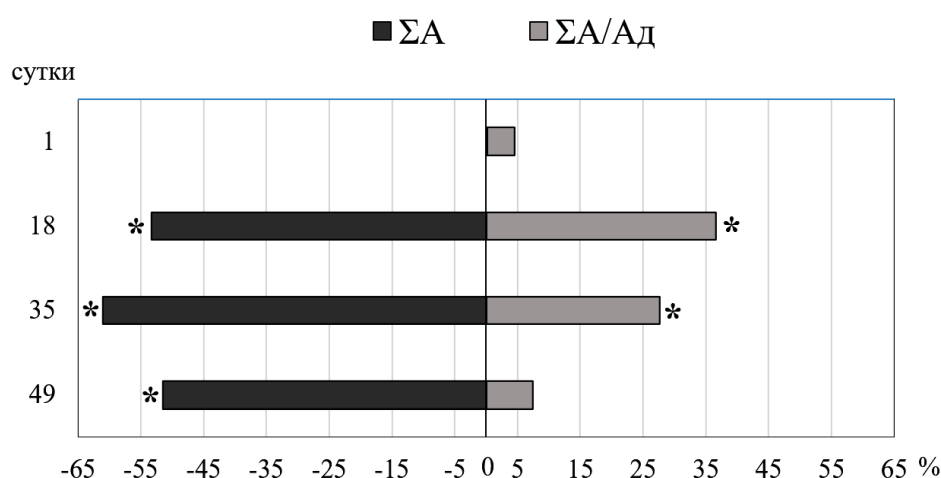


Рис. 5. Изменение притока крови (ΣA) и соотношения притока крови к венозному оттоку ($\Sigma A/A_d$) в микроциркуляторном русле крыс экспериментальной группы с аллоксан-индуцированным диабетом в разные сроки эксперимента (1, 18, 35, 49 сутки) относительно значений в контрольной группе животных, принятых за 100 %.

Примечание: те же, что на рис. 2.

Наблюдаемые изменения сопровождались статистически значимым снижением ПМ у крыс экспериментальной группы на 18, 35 и 49 сутки на 46,28 % ($p<0,001$), 56,59 % ($p=0,016$) и 53,47 % ($p=0,016$; рис. 6) соответственно, что свидетельствует о снижении уровня перфузии МЦР [24].

СКО снизилось на 49,20 % ($p<0,001$), 63,11 % ($p=0,017$) и 66,44 % ($p=0,016$) на 18, 35 и 49 сутки соответственно. Кв также достоверно снизился на 18, 35, 49 сутки на 31,68 % ($p<0,001$), 51,56 % ($p=0,017$), 54,99 % ($p=0,016$) относительно значений в контрольной группе [25]. Данный показатель характеризует относительную вариабельность микрокровотока и позволяет оценить соотношение между СКО и

ПМ, отражая степень гетерогенности капиллярного кровотока, независимо от абсолютных значений перфузии [13, 14].

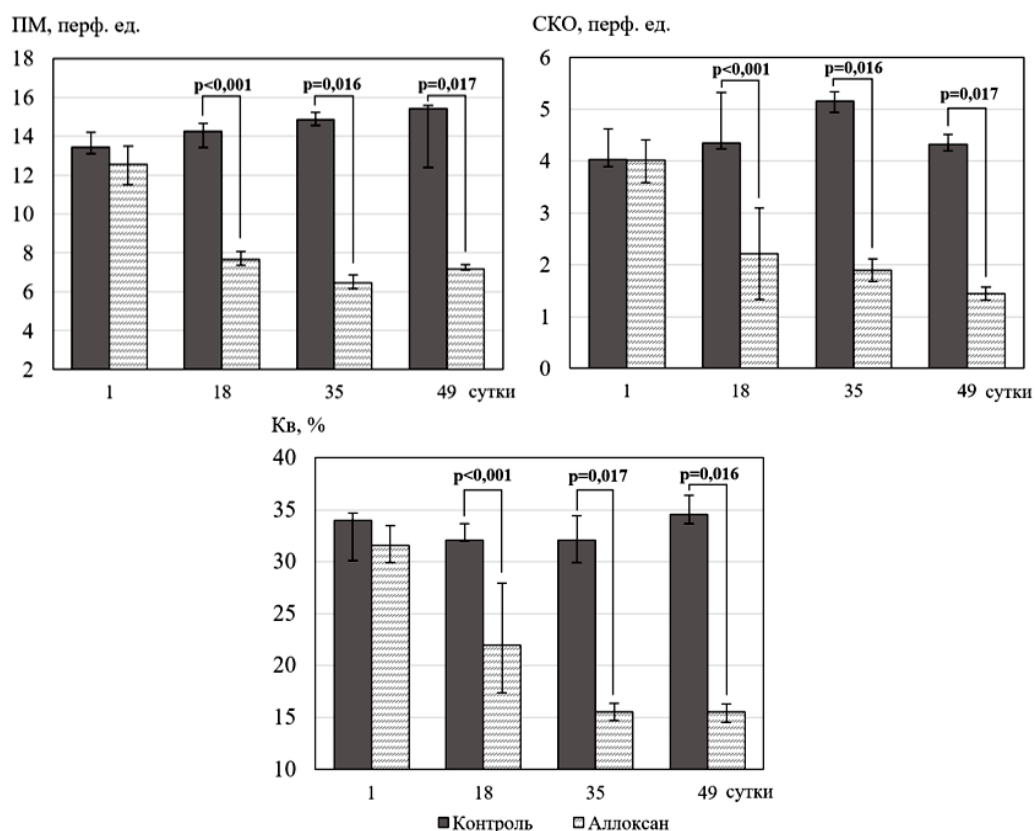


Рис. 6. Динамика показателя микроциркуляции (ПМ), среднего квадратичного отклонения (СКО) и коэффициента вариации (Кв) у крыс контрольной (Контроль) и экспериментальной групп с аллоксан-индуцированным диабетом (Аллоксан) в разные сроки эксперимента (1, 18, 35, 49 сутки).

Примечание: те же, что на рис. 3.

Таким образом, данные изменения неосцилляторных показателей ЛДФ-граммы указывают на снижение перфузии МЦР и утрату гетерогенности капиллярного кровотока, что подтверждает развитие реакции вазоконстрикции, развивающейся на фоне аллоксан-индуцированного диабета.

На 18, 35 и 49 сутки исследования зафиксировано повышение НАДН на 142,76 % ($p=0,030$), 15,86 % ($p=0,030$), 100,00 % ($p=0,022$) на фоне снижения ФАД на 36,71 % ($p=0,003$), 17,97 % ($p=0,016$), 38,02 % ($p=0,017$; рис. 7) соответственно.

Данные кофакторы играют важную роль в реакциях энергетического метаболизма в качестве переносчиков электронов и, обладая флюоресценцией, служат основой для анализа метаболических процессов в живых клетках и тканях.

НАДН находится в клетке в свободном и связанном с белками состоянии. Свободная форма локализуется в цитозоле и отличается от связанной с белком формы спектром эмиссии. Основная флюоресценция испускается связанной формой НАДН, локализованной в митохондриях, тогда как вклад свободной формы относительно мал [26]. Если НАДН локализован в основном в митохондриях и участвует преимущественно в энергетическом обмене клетки, то ФАД содержится как в цитоплазме, так и в митохондриях и задействован помимо окислительного фосфорилирования в различных биохимических процессах (утилизация глутатиона, липогенез, перекисное окисление липидов, антиоксидантные реакции, синтез ацетил-коэнзима А, аскорбат-глутатионовый цикл, пентозофосфатный цикл) [27]. Разнонаправленное изменение НАДН и ФАД свидетельствует об увеличении гликолиза, цикла трикарбоновых кислот и β -окисления жирных кислот, являющихся источниками НАДН, при одновременном угнетении окислительного фосфорилирования [28, 29].

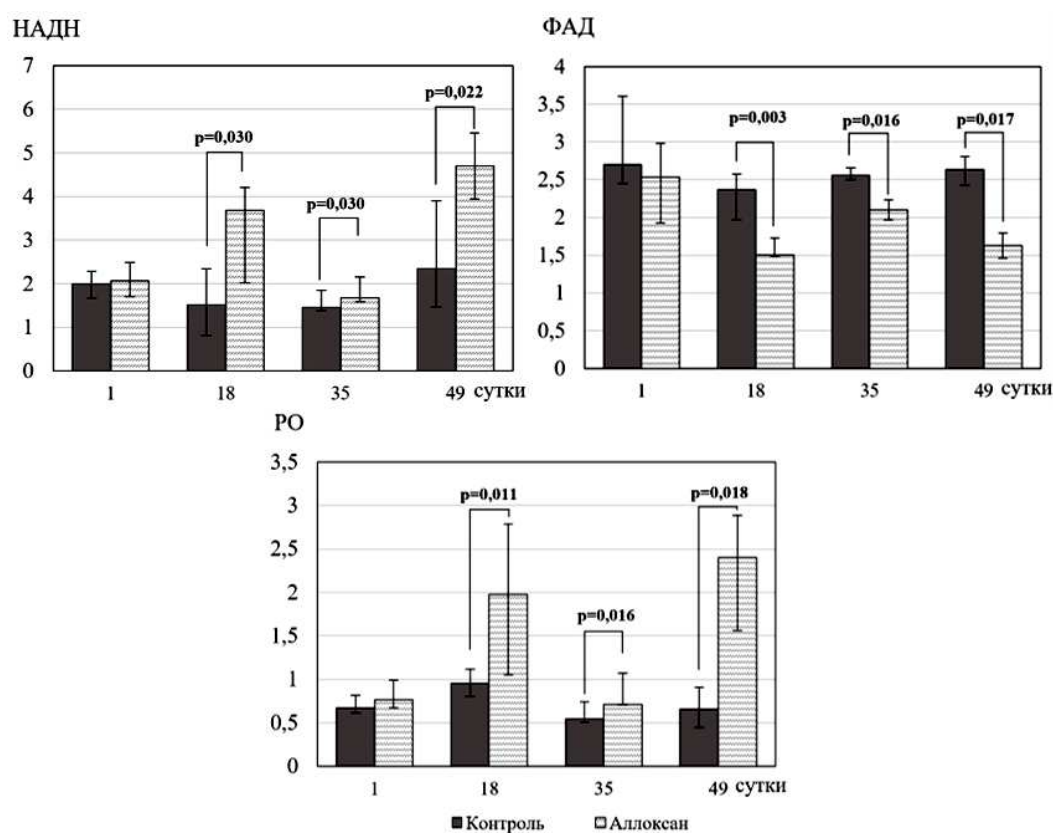


Рис. 7. Динамика показателей НАДН, ФАД и редокс-отношения (PO) у крыс контрольной (Контроль) и экспериментальной групп с аллоксан-индуцированным диабетом (Аллоксан) в разные сроки эксперимента (1, 18, 35, 49 сутки).

Примечание: те же, что на рис. 3.

Поскольку НАДН и ФАД являются единственными формами переносчиков электронов, проявляющими флуоресценцию, отношение их интенсивности флуоресценции (редокс-отношение, РО) обычно используется для оценки метаболического профиля клетки или ткани. На 18, 35 и 49 суток у крыс с аллоксан-индуцированным диабетом регистрировали достоверное повышение РО на 107,55 % ($p=0,011$), 31,08 % ($p=0,016$) и 263,33 % ($p=0,018$) относительно такового у крыс контрольной группы, что указывает на редокс-дисбаланс, характеризующийся накоплением восстановленного НАДН на фоне истощения пула окисленного ФАД [30]. Поскольку основная масса НАДН образуется при гликолизе, а ФАД – при окислительном фосфорилировании, высокое редокс-отношение указывает на преобладание гликолитического пути над окислительным фосфорилированием [31].

Таким образом, проведённое исследование показало, что аллоксан-индуцированный диабет у крыс сопровождается выраженными и прогрессирующими нарушениями МЦ и ТМ. Описанные изменения характерны для диабетической микроангиопатии, которая проявляется в виде нефропатии, нейропатии и ретинопатии [6, 19, 32].

Показано, что при СД микрососудистая дисфункция проявляется гораздо раньше, чем структурные изменения в сердечно-сосудистой системе [19, 32, 33]. Ключевым звеном развития диабетических осложнений является гипергликемия, которая приводит к нарушению биосинтеза NO за счёт усиления окислительного стресса и воспаления, снижения активности факторов вазодилатации и увеличения продукции активных форм кислорода [19, 32]. Гипергликемия приводит к оксидативному стрессу, активации воспалительных процессов и нарушению барьерной функции эндотелия [34]. Эти изменения запускают каскад патологических реакций, приводящих к старению или гибели клеток и, как следствие, способствуют развитию диабетических микрососудистых заболеваний [19, 32]. Именно эндотелиальная дисфункция рассматривается как один из наиболее ранних и «центральных» механизмов диабетической микроангиопатии: нарушается баланс вазодилататоров/вазоконстрикторов; снижается биодоступность NO; увеличивается проницаемость эндотелия; нарушается микроциркуляторная реактивность.

Особого внимания заслуживают выявленные в настоящем исследовании изменения со стороны тканевого метаболизма. При СД нарушается баланс между окислительно-восстановительными коферментами. НАДН вырабатывается в избытке из-за активации гликолиза и цикла Кребса в результате гипергликемии [35]. В β -клетках поджелудочной железы накопление избытка НАДН ингибирует ферменты, продуцирующие его из НАД⁺, что способствует образованию активных форм кислорода, количество которых возрастает пропорционально объёму НАДН [29]. Окислители перегружают антиоксидантные системы клетки, что приводит к митохондриальной дисфункции, повреждению ДНК, липидов и белков [36]. Именно окислительный стресс является одной из наиболее подтверждённых причин микрососудистых осложнений СД, нарушающих эндотелиальную функцию, усиливающих воспаление, способствующих фиброзу и микрососудистой дисрегуляции [29]

Исходя из результатов исследования, становится очевидным, что раннее, неинвазивное комплексное выявление нарушений кожной микрогемодинамики и тканевого метаболизма при СД открывает перспективу ранней диагностики и предотвращения тяжёлых необратимых осложнений (диабетической стопы, ангиопатии, ретинопатии), поскольку, как показывают наши и литературные данные, изменения кожной микрогемодинамики при СД, включающие снижение базальной перфузии и нарушения реактивности (эндотелий- и нейрогенно-зависимых компонентов), могут проявляться рано и коррелировать с метаболическими и другими осложнениями [37]. Установлено, что классические диабетические микроангиопатии (ретинопатия, нефропатия, нейропатия) имеют общие механизмы микрососудистого поражения [38]. Механизмы сосудистых осложнений при диабете (микроангиопатии) тесно связаны с эндотелиальной дисфункцией, оксидативным стрессом, воспалением и AGE–RAGE каскадами (сигнальный путь, который запускается при взаимодействии конечных продуктов гликирования (AGEs) с их рецептором RAGE (*receptor for advanced glycation end products*)), что патогенетически объясняет наблюдаемые изменения кожной МЦ [32].

Полученные данные подтверждают ключевую роль гипергликемии в развитии нарушения окислительно-восстановительного баланса, микроциркуляторной дисфункции при аллоксан-индуцированном диабете, расширяют представления о патогенезе сосудистых осложнений СД и могут быть использованы для оценки эффективности потенциальных антидиабетических и ангиопротекторных средств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Аллоксан-индуцированный диабет у крыс сопровождается выраженными и прогрессирующими нарушениями кожной микрогемодинамики и тканевого метаболизма, заключающимися в гипертензии, угнетении эндотелиального, нейрогенного и миогенного механизмов регуляции, вазоконстрикции микрососудов, нарушении окислительно-восстановительного баланса, что свидетельствует о развитии диабетических макро- и микроангиопатий, митохондриальной дисфункции и окислительного стресса.
2. Анализ динамики показателей кожной микроциркуляции у крыс с аллоксан-индуцированным диабетом выявил прогрессирующий характер нарушений, связанных с развитием эндотелиальной дисфункции, снижением выработки NO в эндотелии, усилением симпатических адренергических влияний на гладкую мускулатуру сосудов, угнетением вазомоторной активности гладкой мускулатуры микрососудов, повышением периферического внутрисосудистого сопротивления, базального тонуса артериол и посткапиллярного сопротивления, снижением общей перфузии, нутритивного кровотока, притока крови в артериолы на фоне уменьшения веноулярного оттока, что свидетельствует о прогрессирующей вазоконстрикции и формировании стойкой, хронической микроциркуляторной дисфункции – диабетической микроангиопатии.
3. Анализ динамики показателей тканевого метаболизма у крыс с аллоксан-индуцированным диабетом выявил повышение уровня восстановленного

никотинамидадениндинуклеотида (НАДН, максимально на 142,76 % ($p=0,030$) на 18 сутки наблюдения), увеличение редокс-отношения (максимально на 263,33 % ($p=0,018$) на 49 сутки наблюдения) на фоне снижения содержания флавинадениндинуклеотида (ФАД, максимально на 38,02 % ($p=0,017$) на 49 сутки наблюдения) относительно значений этих показателей у крыс контрольной группы, что свидетельствует о преобладании гликолитического пути над окислительным фосфорилированием, нарушении окислительно-восстановительного баланса и работы митохондриального дыхательного комплекса, усугубляющих эндотелиальную дисфункцию.

Список литературы

1. Дедов И. И. Сахарный диабет типа 1. Реалии и перспективы / И. И. Дедов, М. В. Шестакова // Москва : МИА, 2016. – 504 с.
2. Ong K. L. Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021 / K. L. Ong, L. K. Stafford, S. A. McLaughlin, E. J. Boyko // The Lancet. – 2023. – Vol. 402, No. 10397. – P. 203–234.
3. Аннайева О. Т. Сахарный диабет: этиология и патогенез / О. Т. Аннайева // Символ науки. – 2025. – № 1–1–2. – С. 93–94.
4. Клыпа Т. В. Гипергликемия критических состояний / Т. В. Клыпа, М. С. Орехова, Л. И. Забросаева // Сахарный диабет. – 2015. – 18(1). – С. 33–41.
5. Fuchs D. The association between diabetes and dermal microvascular dysfunction non-invasively assessed by laser Doppler with local thermal hyperemia: a systematic review with meta-analysis / D. Fuchs, P. P. Dupon, L. A. Schaap, R. Draijer // Cardiovasc Diabetol. – 2017. – 16(1). – P. 11.
6. Mengstie M. A. Endogenous advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic diabetic complications / M. A. Mengstie, E. Chekol Abebe, A. Behaile Teklemariam, A. Tilahun Mulu, M. M. Agidew, M. Teshome Azezew, E. A. Zewde, A. Agegnehu Teshome // Front Mol Biosci. – 2022. – 1002710.
7. Булава Е. В. Факторы прогрессирования диабетической ретинопатии и развития макулярного отека после трансплантации поджелудочной железы / Е. В. Булава, Г. Ш. Аржиматова, М. В. Гусаков, И. В. Дмитриев // Сахарный диабет. – 2025. – 28(3). – С. 252–261.
8. Mordes J. P. LEW.1WR1 rats develop autoimmune diabetes spontaneously and in response to environmental perturbation / J. P. Mordes, D. L. Guberski, J. H. Leif, B. A. Woda, J. F. Flanagan, D. L. Greiner, E. H. Kislauskis, R. S. Tirabassi // Diabetes. – 2005. – 54(9). – P. 2727–2733.
9. Данилова И. Г. Способ моделирования аллоксанового диабета / И. Г. Данилова, И. Ф. Гетте : пат. № 2534411 Рос. Федерация. – Заявл. 27.11.2014; опубл. 27.11.2014. – Бюл. № 33.
10. Чуян Е. Н. Метаболические нарушения у крыс с аллоксан-индуцированным диабетом / Е. Н. Чуян, С. Ю. Ливенцов, Н. И. Дворецкая // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2025. – № 2. – С. 281–302.
11. Humeau A. Time-frequency analysis of laser Doppler flowmetry signals recorded in response to a progressive pressure applied locally on anaesthetized healthy rats / A. Humeau, A. Kontka, P. Abraham // Phys Med Biol. – 2004. – 49(5). – P. 843–857.
12. Чуян Е. Н. Изменение показателей микро- и центральной гемодинамики у крыс при действии ацетилсалициловой кислоты и ее координационных соединений с металлами / Е. Н. Чуян, И. С. Миронюк, М. Ю. Раваева, Т. В. Гришина, И. В. Черетаев, С. Е. Чернобай // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2021. – 20(4). – С. 75–86.
13. Козлов В. И. Лазерная доплеровская флоуметрия в оценке состояния и расстройств микроциркуляции крови / В. И. Козлов, Г. А. Азизов, О. А. Гурова, Ф.Б. Литвин – М. : РУДН, 2012. – 32 с.
14. Крупаткин А. И. Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови / А. И. Крупаткин, В. В. Сидоров. – М. : Медицина. – 2005. – 254 с.

15. Чуян Е. Н. Показатели кардиореспираторной системы крыс при действии ацетилсалициловой кислоты и ее комплексных соединений с металлами / Е. Н. Чуян, И. С. Миронюк, М. Ю. Раваева, И. В. Черетаев, Т. В. Гришина // Ученые записки Крымского федерального университета им. В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2020. – С. 267–280.
16. Раваева М. Ю. Тканевой окислительный метаболизм и микрогемодинамика кожи у крыс, находящихся в условиях воздействия стресс-факторов разной продолжительности и их комбинаций / М. Ю. Раваева, И. В. Черетаев, Е. Н. Чуян, П. А. Галенко-Ярошевский, Э. Р. Джелдубаева, И. С. Миронюк // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2023. – 21(4). – С. 357–366.
17. Потешкина Н. Г. Лечение артериальной гипертензии при сахарном диабете / Н. Г. Потешкина, Е. Ю. Мирина // РМЖ. – 2010. – С. 565.
18. Bulum T. Blood pressure is associated with diabetic retinopathy in type 1 but not in type 2 diabetes / T. Bulum, M. Tomić, R. Vrabec // Acta Clin Croat. – 2022. – P. 14–22.
19. Jan Y. K. Diagnosis, pathophysiology and management of microvascular dysfunction in diabetes mellitus / Y. K. Jan, N. Kelhofer, T. Tu // Diagnostics (Basel). – 2024. – 14(24). – P. 2830.
20. Roumenina L. T. Endothelial cells: source, barrier, and target of defensive mediators / L. T. Roumenina, J. Rayes, M. Frimat, V. Fremeaux-Bacchi // Immunol Rev. – 2016. – 274. – P. 307–329.
21. Kralj L. Wavelet analysis of laser Doppler microcirculatory signals: Current applications and limitations / L. Kralj, H. Lenasi // Frontiers in Physiology. – 2023. – 70(3). – P. 1–15.
22. Dremine V. Dynamic evaluation of blood flow microcirculation by combined use of the laser Doppler flowmetry and high-speed videocapillaroscopy methods / V. Dremine, I. Kozlov, M. Volkov // J Biophotonics. – 2019. – 12(6).
23. Mizeva I. Spatial heterogeneity of cutaneous blood flow respiratory-related oscillations quantified via laser speckle contrast imaging / I. Mizeva, E. Potapova, V. Dremine // PLoS ONE. – 2021. – P. 1–15.
24. Сидоров В. В. Система локальных анализаторов для неинвазивной диагностики общего состояния компартментов микроциркуляторно-тканевой системы кожи человека / В. В. Сидоров, Ю. Л. Рыбаков, В. М. Гукасов, Г. С. Евтушенко // Медицинская техника. – 2021. – 6(330). – С. 4–6.
25. Крупаткин А. И. Колебания кровотока – новый диагностический язык в исследовании микроциркуляции / А. И. Крупаткин // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2014. – 13(1). – С. 83–99.
26. Chorvat D. Multi-wavelength fluorescence lifetime spectroscopy: a new approach to the study of endogenous fluorescence in living cells and tissues / D. Chorvat, A. Chorvatova // Laser Phys Lett – 2009. – 6(3). – P. 175–193.
27. Blacker T. S. Separating NADH and NADPH fluorescence in live cells and tissues using FLIM / T. S. Blacker, Z. F. Mann, J. E. Gale, M. Ziegler, A. J. Bain, G. Szabadkai, M. R. Duchon // Nat Commun. – 2014. – 5(1). – P. 3936
28. Lukina M. M. Metabolic imaging for the study of oncological processes (review) / M. M. Lukina, M. V. Shirmanova, T. F. Sergeeva, E. V. Zagaynova // Sovremennye tehnologii v medicine. – 2016. – 8(4). – С. 113–121.
29. Xie N. NAD⁺ metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential / N. Xie, L. Zhang, W. Gao [et al.] // Sig Transduct Target Ther. – 2020. – 227 p.
30. Georgakoudi I. Optical imaging using endogenous contrast to assess metabolic state / I. Georgakoudi, K. P. Quinn // Annu Rev Biomed Eng. – 2012. – P. 351–367.
31. Staniszewski K. Surface fluorescence studies of tissue mitochondrial redox state in isolated perfused rat lungs / K. Staniszewski, S. H. Audi, R. Sepehr, E. R. Jacobs, M. Ranji // Ann Biomed Eng. – 2013. – 41(4). – P. 827–836.
32. Yang D. R. Endothelial dysfunction in vascular complications of diabetes: a comprehensive review of mechanisms and implications / D. R. Yang, M. Y. Wang, C. L. Zhang, Y. Wang // Front Endocrinol. – 2024. – Vol. 15. – P. 1359255.
33. Love K. M. Predictors of arterial stiffness in adolescents and adults with type 1 diabetes: a cross-sectional study / K. M. Love, W. B. Horton, J. T. Patrie // BMJ Open Diabetes Res Care. – 2022. – 10(1). – e002491.

34. Salvatore T. Coronary microvascular dysfunction in diabetes mellitus: pathogenetic mechanisms and potential therapeutic options / T. Salvatore, R. Galiero, A. Caturano // *Biomedicines*. – 2022. – 10(9). – P. 2274.
35. Yan L. J. NADH/NAD⁺ Redox Imbalance and Diabetic Kidney Disease / L. J. Yan // *Biomolecules*. – 2021. – 11(5). – P. 730.
36. Wu J. Sources and implications of NADH/NAD⁺ redox imbalance in diabetes and its complications / J. Wu, Z. Jin, H. Zheng, L. J. Yan // *Diabetes Metab Syndr Obes*. – 2016. – P. 145–153.
37. Sorelli M. Assessment of cutaneous microcirculation by laser Doppler flowmetry in type 1 diabetes / M. Sorelli, P. Francia, L. Bocchi, A. De Bellis, R. Anichini // *Microvasc Res*. – 2019. – 124. – P. 91–96.
38. Madonna R. Diabetic microangiopathy: Pathogenetic insights and novel therapeutic approaches / R. Madonna, C. R. Balistreri, Y. J. Geng, R. De Caterina // *Vasc Pharmacol*. – 2017. – 90. – P. 1–7.

CHANGES IN SKIN MICROCIRCULATION AND TISSUE METABOLISM DURING THE DEVELOPMENT OF ALLOXAN-INDUCED DIABETES IN RATS

Chuyan E. N., Murtazaeva A. M., Liventsov S. Yu.

*Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education “Crimean Federal
University named after V. I. Vernadsky”, Simferopol, Republic of Crimea, Russia
E-mail: elena-chuyan@rambler.ru*

A study was conducted on changes in skin microcirculation and tissue metabolism in a rat model of alloxan-induced diabetes. It was shown that alloxan-induced diabetes in rats is accompanied by pronounced and progressive disturbances of skin microhemodynamics and tissue metabolism, including hypertension, suppression of endothelial, neurogenic, and myogenic regulatory mechanisms, vasoconstriction of microvessels, and an imbalance in redox status, indicating the development of diabetic macro- and microangiopathies, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress. Analysis of the dynamics of skin microcirculation parameters in rats with alloxan-induced diabetes revealed a progressive pattern of disturbances associated with endothelial dysfunction, attenuation of sympathetic adrenergic influences on vascular smooth muscle, suppression of vasomotor activity of microvascular smooth muscle, increased peripheral resistance, elevated basal arteriolar tone and postcapillary resistance, reduced total perfusion and nutritive blood flow, reduced arterial inflow in the presence of impaired venular outflow, and a decreased number of functioning capillaries. These findings indicate progressive vasoconstriction and the formation of a persistent, chronic microcirculatory dysfunction – diabetic microangiopathy. Analysis of the dynamics of tissue metabolism parameters in rats with alloxan-induced diabetes revealed an increase in the level of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) by 142,76 % ($p = 0,030$) on day 18 of observation, an increase in the redox ratio by 263,33 % ($p = 0,018$) on day 49 of observation, along with a decrease in flavin adenine dinucleotide (FAD) by 38,02 % ($p = 0,017$) on day 49 of observation, relative to the values of these parameters in the control group rats. These results indicate a predominance of the glycolytic pathway over oxidative phosphorylation,

a disturbance of the redox balance and function of the mitochondrial respiratory chain, thereby exacerbating endothelial dysfunction.

Keywords: type 1 diabetes mellitus, alloxan-induced diabetes, vasoactive action, tissue microcirculation, tissue metabolism, vascular tone, vasoconstriction, blood pressure.

References

1. Dedov I. I., Shestakova M. V. *Saharnyj diabet tipa 1. Realii i perspektivy* (Moskva : MIA 2016).
2. Ong K. L., Stafford L. K., McLaughlin S. A., Boyko E. J. Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021, *The Lancet*, **402**, 10397 (2023).
3. Annajeva O. T. *Saharnyj diabet: etiologija i patogenez*, 1–1–2 (Simvol nauki, 2025).
4. Klypa T. V., Orehova M. S., Zabrosaeva L. I. Giperglikemija kriticheskikh sostojanij, *Saharnyj diabet*, **18**, 1 (2015).
5. Fuchs D., Dupon P. P., Schaap L. A., Draijer R. The association between diabetes and dermal microvascular dysfunction non-invasively assessed by laser Doppler with local thermal hyperemia: a systematic review with meta-analysis, *Cardiovasc Diabetol*, **16**, 1 (2017).
6. Mengstie M. A., Chekol Abebe E., Behaile Teklemariam A. [et al.] Endogenous advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic diabetic complications, *Front Mol Biosci* (2022).
7. Bulava E. V., Arzhimatova G. Sh., Gusakov M. V., Dmitriev I. V. Faktory progressirovaniya diabeticheskoy retinopatii i razvitiya makuljarnogo oteka posle transplantacii podzheludochnoj zhelezy, *Saharnyj diabet*, **28**, 3 (2025).
8. Mordes J. P., Guberski D. L., Leif J. H. [et al.] LEW.1WR1 rats develop autoimmune diabetes spontaneously and in response to environmental perturbation, *Diabetes*, **54**, 9 (2005).
9. Danilova I. G., Gette I. F. *Sposob modelirovaniya alloksanovogo diabeta*, Patent № 2534411, 2014.
10. Chujan E. N., Livencov S. Ju., Dvoreckaja N. I. Metabolicheskie narushenija u krys s alloksan-inducirovannym diabetom, *Uchenye zapiski Krymskogo federal'nogo universiteta imeni V. I. Vernadskogo. Biologija. Himija*, **2** (2025).
11. Humeau A., Kontka A., Abraham P. Time-frequency analysis of laser Doppler flowmetry signals recorded in response to a progressive pressure applied locally on anaesthetized healthy rats, *Phys Med Biol*, **49**, 5 (2004).
12. Chujan E. N., Mironjuk I. S., Ravaeva M. Ju. [et al.] Izmenenie pokazatelej mikro- i central'noj gemodinamiki u krys pri dejstvii acetylsalicylovoj kisloty i ee koordinacionnyh soedinenij s metallami, *Regionarnoe krovoobrashhenie i mikrocirkuljacija*, **20**, 4 (2021).
13. Kozlov V. I., Azizov G. A., Gurova O. A., Litvin F. B. *Lazernaja dopplerovskaja floumetrija v ocenke sostojanija i rassstrojstv mikrocirkuljacji krovi* (M. : RUDN, 2012).
14. Krupatkin A. I., Sidorov V. V. *Lazernaja dopplerovskaja floumetrija mikrocirkuljacji krovi* (M. : Medicina, 2005).
15. Chujan E. N., Mironjuk I. S., Ravaeva M. Ju., Cheretaev I. V., Grishina T. V. Pokazateli kardiorespiratornoj sistemy krys pri dejstvii acetylsalicylovoj kisloty i ee kompleksnyh soedinenij s metallami, *Uchenye zapiski Krymskogo federal'nogo universiteta im. V. I. Vernadskogo. Biologija. Himija* (2020).
16. Ravaeva M. Ju., Cheretaev I. V., Chujan E. N. [et al.] Tkanevoj okislitel'nyj metabolizm i mikrogemodinamika kozhi u krys, nahodjashhihsja v uslovijah vozdejstvija stress-faktorov raznoj prodolzhitel'nosti i ih kombinacij, *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoj terapii*, **21**, 4 (2023).
17. Poteshkina N. G., Mirina E. Ju. Lechenie arterial'noj gipertenzii pri saharanom diabete, *RMZh*, 565 (2010).
18. Bulum T., Tomić M., Vrabec R. Blood pressure is associated with diabetic retinopathy in type 1 but not in type 2 diabetes, *Acta Clin Croat*, 265, 14 (2022).
19. Jan Y. K., Kelhofer N., Tu T. Diagnosis, pathophysiology and management of microvascular dysfunction in diabetes mellitus, *Diagnostics (Basel)*, **14**, 24 (2024).
20. Roumenina L. T., Rayes J., Frimat M., Fremeaux-Bacchi V. Endothelial cells: source, barrier, and target of defensive mediators, *Immunol Rev*, 274 (2016).

21. Kralj L., Lenasi H. Wavelet analysis of laser Doppler microcirculatory signals: Current applications and limitations, *Frontiers in Physiology*, **70**, 3 (2023).
22. Dremine V., Kozlov I., Volkov M. Dynamic evaluation of blood flow microcirculation by combined use of the laser Doppler flowmetry and high-speed videocapillaroscopy methods, *J Biophotonics*, **12**, 6 (2019).
23. Mizeva I., Potapova E., Dremine V. Spatial heterogeneity of cutaneous blood flow respiratory-related oscillations quantified via laser speckle contrast imaging, *PLoS ONE*, 267 (2021).
24. Sidorov V. V., Rybakov Ju. L., Gukasov V. M., Evtushenko G. S. Sistema lokal'nyh analizatorov dlja neinvazivnoj diagnostiki obshhego sostojanija kompartmentov mikroциркуляторно-тканевых системы кожи человека, *Medicinskaja tehnika*, **6**, 330 (2021).
25. Krupatkin A. I. Kolebanija krovotoka – novyj diagnosticheskij jazyk v issledovanii mikroциркуляcii, *Regionarnoe krovoobrashhenie i mikroциркуляcija*, **13**, 1 (2014).
26. Chorvat D., Chorvatova A. Multi-wavelength fluorescence lifetime spectroscopy: a new approach to the study of endogenous fluorescence in living cells and tissues, *Laser Phys Lett*, **6**, 3 (2009).
27. Blacker T. S., Mann Z. F., Gale J. E. [et al.] Separating NADH and NADPH fluorescence in live cells and tissues using FLIM, *Nat Commun*, **5**(1), 3936 (2014).
28. Lukina M. M., Shirmanova M. V., Sergeeva T. F., Zagaynova E. V. Metabolical imaging for the study of oncological processes (review), *Sovremennye tehnologii v medicine*, **8**, 4 (2016).
29. Xie N., Zhang L., Gao W. [et al.] NAD⁺ metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential, *Sig Transduct Target Ther*, 227 (2020).
30. Georgakoudi I., Quinn K. P. Optical imaging using endogenous contrast to assess metabolic state, *Annu Rev Biomed Eng*, 351 (2012).
31. Staniszewski K., Audi S. H., Sepehr R., Jacobs E. R., Ranji M. Surface fluorescence studies of tissue mitochondrial redox state in isolated perfused rat lungs, *Ann Biomed Eng*, **41**, 4 (2013).
32. Yang D. R., Wang M. Y., Zhang C. L., Wang Y. Endothelial dysfunction in vascular complications of diabetes: a comprehensive review of mechanisms and implications, *Front Endocrinol*, **15**, 1359255. (2024).
33. Love K. M., Horton W. B., Patrie J. T. Predictors of arterial stiffness in adolescents and adults with type 1 diabetes: a cross-sectional study, *BMJ Open Diabetes Res Care*, **10**, 1 (2022).
34. Salvatore T., Galiero R., Caturano A. Coronary microvascular dysfunction in diabetes mellitus: pathogenetic mechanisms and potential therapeutic options, *Biomedicine*, **10**, 9 (2022).
35. Yan L. J. NADH/NAD⁺ Redox Imbalance and Diabetic Kidney Disease, *Biomolecules*, **11**, 5 (2021).
36. Wu J., Jin Z., Zheng H., Yan L. J. Sources and implications of NADH/NAD⁺ redox imbalance in diabetes and its complications, *Diabetes Metab Syndr Obes* (2016).
37. Sorelli M., Francia P., Bocchi L., De Bellis A., Anichini R. Assessment of cutaneous microcirculation by laser Doppler flowmetry in type 1 diabetes, *Microvasc Res*, 124 (2019).
38. Madonna R., Balistreri C. R., Geng Y. J., De Caterina R. Diabetic microangiopathy: Pathogenetic insights and novel therapeutic approaches, *Vasc Pharmacol*, 90 (2017).