

УДК 616.43;616-008.9;616.39

Н. В. Кресюн, канд. мед. наук, доц.

**АНТИОКСИДАНТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ
СЕТЧАТОЙ ОБОЛОЧКИ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИАБЕТЕ
В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ
ДЕЛЬТА-СОН ИНДУЦИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА
И ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИИ ПАЛЕОЦЕРЕБЕЛЛУМА**

Одесский национальный медицинский университет

Механизмы генерирования перекисных соединений играют важную роль в патогенезе диабетической ретинопатии [6; 10]. Применение антиоксидантов обеспечивает протекторные эффекты как при ишемической, так и диабетической ретинопатии [1; 8; 11]. Показано, что под влиянием электрических стимуляций (ЭС) структур мозжечка — ядра шатра — предотвращаются вызванные ишемией морфофункциональные нарушения проявлений со стороны сетчатой оболочки глаза [9]. Один из возможных механизмов реализации данного эффекта — активирование антиоксидантных механизмов, что отмечается как в крови, так и в ткани головного мозга при ЭС структур мозжечка [2]. С другой стороны, известны выраженные антиоксидантные эффекты применения дельта-сон индуцирующего пептида (ДСИП) [3; 4], которые могут обеспечивать эффективность пептида на модели ишемии головного мозга [2]. Однако до последнего времени действие указанных факторов не было исследовано в отношении проявлений диабетической ретинопатии, индуцированной применением стрептозотоцина (СТЦ).

Цель настоящего исследования — изучение выраженности нарушений со стороны тиолдисульфидной и аскорбатной антиоксидантных систем в ткани сетчатой оболочки глаз крыс с моделированным экспериментальным диабетом, а также особенностей состояния указанных систем на фоне раздельного и сочетанного применения ЭС палеоцеребеллярной коры мозжечка и введения ДСИП.

**Материалы и методы
исследования**

Исследования выполнены в условиях хронического эксперимента на крысах-самцах линии Вистар, которые содержались в стандартных условиях вивария Одесского национального медицинского университета (ОНМедУ). Исследования проводили в соответствии с требованиями GLP и комиссии по биоэтике ОНМедУ (протокол № 84 от 10 октября 2008 г.). Экспериментальный сахарный диабет вызывали внутрибрюшинным (в/бр) введением натошак СТЦ в дозе 50,0 мг/кг (“Sigma Aldrich.ru”, Российская Федерация), который растворяли в буферном натриево-цитратном растворе (рН 4,5).

Через одну и две недели с момента применения СТЦ у жи-

вотных в венозной крови, которую получали из хвостовой вены, определяли содержание глюкозы и в дальнейших наблюдениях использовали крыс, у которых этот уровень составлял более 300 мг/л [8]. Содержание глюкозы измеряли в 9.00 в условиях доступа животных к пище в ночное время. В течение всего наблюдения животным вводили инсулин (0,5–2,0 ЕД подкожно два–пять раз в неделю) [8].

На 5–7-е сутки с момента введения СТЦ животных оперировали под нембуталовым наркозом (40,0 мг/кг, в/бр), под визуальным контролем вживляли биполярные нихромовые электроды (диаметр 0,15 мм, межэлектродное расстояние — 0,25–0,30 мм) в палеоцеребеллярные участки мозжечка (V–VII дольки). Электроды крепили к поверхности черепа быстро-твердеющей пластмассой «Норакрил». По завершении операции животным вводили стрептомицин и бензилпенициллин натрия (50 000 МЕ/кг внутримышечно). Через 14 дней с момента применения СТЦ животных подразделяли на группы:

— группа 1 — интактные (ложнооперированные) — 11 крыс;

— группа 2 — ложнооперированные с применением СТЦ — 13 крыс;

— группа 3 — с применением СТЦ и введением ДСИП — 10 крыс;

— группа 4 — с применением СТЦ и ЭС палеоцеребеллярной коры — 9 крыс;

— группа 5 — с применением СТЦ и совместным использованием ДСИП и ЭС палеоцеребеллума — 9 животных.

Электростимуляцию мозжечка проводили прямоугольными импульсами, используя силу тока 80 мкА, длину импульсов 0,3 мс и частоту 100 Гц [2]. Длительность стимуляции составила 2–2,5 с, частота — 2 раза в сутки (9.00–10.00 и 17.00–18.00).

Проводили ЭС на протяжении двух последующих недель. Крысам контрольной группы осуществляли ложные ЭС (временная иммобилизация, подсоединение к стимулятору без воздействия электрическими импульсами). Весь период наблюдения животных содержали в условиях свободного доступа к пище и воде и проводили взвешивание на каждые третьи сутки. Объем выделенной мочи за сутки измеряли в течение 2–3 последовательных суток каждые 2 мес. Суточное количество потребленной пищи определяли каждую неделю наблюдений.

Введения ДСИП (“Sigma-Aldrich Chemie GmbH”, Германия) проводили однократно ежедневно (8.00) в дозе 50,0 мкг/кг, в/бр в объеме 0,5 мл свежеприготовленного раствора, в 0,9 % растворе NaCl. Животным контрольной группы в аналогичных условиях вводили 0,5 мл физиологического 0,9 % раствора NaCl.

По завершении наблюдений осуществляли эктаназию и извлекали ткани глазного яблока.

После выделения сетчатой оболочки обоих глаз животного ее гомогенизировали в 9 объемах 0,15 М KCl на холоду, который содержал также 1 мМ

EDTA, что позволяло приготовить 10 % гомогенат (по содержанию в ткани сетчатки). Данный гомогенат был использован в дальнейшем для изучения содержания SH- и SS-групп, аскорбиновой кислоты (АК; общей, редуцированной и окисленной форм), что осуществляли с помощью амперометрического титрования [5].

Результаты исследования обрабатывали статистически с применением метода ANOVA и теста Newman–Keuls.

Результаты исследования и их обсуждение

К концу наблюдения у крыс с диабетом в отсутствие разработанных методов лечения масса тела превышала таковую до начала эксперимента на 6,5 % ($p > 0,05$), в то время как у крыс группы контроля этот показатель составил 34,1 % ($p < 0,05$) (табл. 1).

Уровень тиоловых групп в ткани сетчатой оболочки крыс

с диабетом был на 41,4 % меньше в сравнении с таковым у животных группы контроля, т. е. интактных крыс ($p < 0,05$), в то время как содержание SS-групп превышало соответствующий показатель в группе контроля в 1,5 раза ($p < 0,05$). При этом общее содержание тиол-дисульфидных групп у крыс с СТЦ-моделированным диабетом было на 22,3 % меньше, чем в группе контроля ($p < 0,05$; табл. 2).

В группе крыс, которым применяли ДСИП, содержание тиоловых групп оставалось меньшим в сравнении с таковым, отмечавшимся в группе интактных животных (на 28,0 %, $p < 0,05$), хотя возрастало в сравнении с показателем у крыс с диабетом (на 22,8 %; $p > 0,05$). Соответствующие межгрупповые отличия у крыс с применением ЭС мозжечка составили 22,3 % ($p > 0,05$) и 32,6 % ($p < 0,05$). В то же время при одновременном применении ДСИП и ЭС мозжечка содержание

Таблица 1

Динамика уровня глюкозы и массы тела в группах животных с различным лечением сахарного диабета, $M \pm m$

Показатель	Группа	
	Контроль	Диабет
Глюкоза крови, ммоль/л		
Начальная	5,75±0,43	19,33±0,27
Окончание наблюдения	5,94±0,47	22,70±2,11
Масса тела, г		
Начальная	214,0±16,1	183,0±16,5
Окончание наблюдения	287,0±18,2*	195,0±23,5

Примечание. * — $p < 0,05$ в сравнении с показателем у животных до начала наблюдения.

Таблица 2

Содержание тиоловых групп в гомогенате ткани сетчатки, $\mu\text{моль/г}$, $M \pm m$

Группа	Контроль, n=11	Диабет, n=13	Диабет + ДСИП, n=10	Диабет + ЭС мозжечка, n=9	Диабет + ДСИП + ЭС мозжечка, n=9
SH-	1,57±0,11	0,92±0,07*	1,13±0,11*	1,22±0,08#	1,37±0,13#
SS-	0,41±0,04	0,62±0,06*	0,57±0,04*	0,49±0,04	0,42±0,05#
Общие SH- + SS-	1,98±0,10	1,54±0,07*	1,70±0,07*	1,71±0,07	1,79±0,08

Примечание. В табл. 2, 3: * — $p < 0,05$ в сравнении с показателем у животных в группе контроля; # — $p < 0,05$ в сравнении с показателем у животных с моделированным сахарным диабетом.

тиоловых групп возрастало в сравнении с таковым в группе нелеченых крыс с диабетом на 48,9 % ($p < 0,05$) и было на 12,7 % меньше, чем у интактных крыс ($p > 0,05$).

Уровень дисульфидных групп у крыс с применением ДСИП был на 39,0 % выше, чем у крыс группы контроля ($p < 0,05$), и при этом уменьшался в сравнении с данным показателем у диабетических крыс без лечения на 8,1 % ($p > 0,05$). В условиях применения ЭС мозжечка соответствующие показатели составляли 19,5 % ($p > 0,05$) и 21,0 % ($p > 0,05$). При сочетанном применении ДСИП и ЭС мозжечка регистрировалось достоверное снижение содержания дисульфидных групп в сравнении с показателем у нелеченых крыс с моделированным диабетом (на 32,3 %; $p < 0,05$) при незначительном (на 2,4 %; $p > 0,05$) превышении аналогичного показателя у интактных крыс.

Общее содержание тиоловых и дисульфидных групп в ткани сетчатой оболочки глаза в условиях применения одного ДСИП оставалось на 14,2 % меньшим, чем в группе интактных животных ($p < 0,05$), и при этом превышало показатель в группе нелеченых диабетических крыс на 10,4 % ($p > 0,05$). У крыс с применением одной ЭС мозжечка данные показатели составили 13,6 % ($p > 0,05$) и 11,0 % ($p > 0,05$), а в группе животных с комбинированным применением ДСИП и ЭС мозжечка — 9,6 и 16,2 % ($p > 0,05$) соответственно (см. табл. 2).

Содержание восстановленной формы АК в ткани сетчатки крыс с диабетом было в 7,64 раза меньше в сравнении с таковым

у интактных животных ($p < 0,05$), в то время как окисленные формы были снижены в сравнении с аналогичным показателем в группе контроля в 1,94 раза ($p < 0,05$). При этом общее содержание АК также было более низким — в 5,57 раза в сравнении с группой контроля ($p < 0,05$; табл. 3).

При применении ДСИП отмечалось возрастание содержания восстановленной АК — в 2,07 раза в сравнении с аналогичным показателем у диабетических животных, не получавших лечения ($p < 0,05$). При этом исследуемый показатель оставался в 3,7 раза меньше, чем у интактных крыс ($p < 0,05$). Сходные отличия между группами у крыс с применением ЭС мозжечка составили 2,3 и 3,34 раза ($p < 0,05$). Одновременное применение ЭС мозжечка и ДСИП сопровождалось увеличением содержания восстановленной формы АК в 4,5 раза в сравнении с величиной данного показателя у диабетических крыс без лечения ($p < 0,05$); при этом различия с группой интактных крыс составили 40,7 % ($p < 0,05$). Следует отметить, что содержание восстановленной АК в группе с сочетанным применением ДСИП и ЭС мозжечка было достоверно большим в сравнении с раздельным применением указанных факторов — соответственно в 2,2 и в 2,0 раза ($p < 0,05$).

Менее выраженными были отличия в содержании окисленных форм АК между исследуемыми группами (см. табл. 2). Так, отмечалось уменьшение содержания окисленной формы АК в условиях применения ДСИП — в 1,9 раза в сравнении

с таковым в группе интактных крыс ($p > 0,05$), и сохранялись достоверные (39,4 %) отличия в сравнении с соответствующим показателем в группе контроля ($p < 0,05$). У крыс с применением ЭС мозжечка регистрировалось сниженное в сравнении с группой контроля содержание окисленных форм АК (на 30,3 %; $p > 0,05$), а также более высокое значение данного показателя в сравнении с диабетическими крысами без лечения (на 35,3 %; $p > 0,05$). В группе с сочетанным применением ДСИП и ЭС мозжечка исследуемый показатель достоверно превышал таковой, зарегистрированный в группе крыс с диабетом, — в 1,82 раза ($p < 0,05$) в отсутствие достоверных различий с аналогичным показателем в других группах наблюдения ($p > 0,05$).

Общее содержание АК под влиянием применения ДСИП достоверно возрастало в сравнении с таковым у крыс с диабетом без лечения — на 73,3 % ($p < 0,05$) и при этом было в 3,2 раза ниже в сравнении с крысами группы контроля ($p < 0,05$). Аналогичные показатели отличий между группами для крыс с ЭС мозжечка составили соответственно 93,3 и 65,3 % ($p < 0,05$). В то же время при сочетанном применении ДСИП и ЭС мозжечка содержание АК превышало показатель в группе животных с диабетом в отсутствие лечения в 3,5 раза ($p < 0,05$) и при этом оставалось на 37,0 % ниже в сравнении с показателем у интактных крыс ($p < 0,05$; см. табл. 3).

Следует также отметить, что общее содержание АК в группе животных с сочетанным применением — ДСИП + ЭС было

Таблица 3

Содержание аскорбиновой кислоты в ткани сетчатки, ммоль/г, $M \pm m$

Форма АК	Контроль, n=11	Диабет, n=13	Диабет + ДСИП	Диабет + ЭС мозжечка	Диабет + ДСИП + ЭС мозжечка
Восстановленная	2,14±0,12	0,28±0,04*	0,58±0,07**	0,64±0,07**	1,27±0,09**
Окисленные	0,33±0,04	0,17±0,03*	0,20±0,03*	0,23±0,04	0,31±0,05#
Общая	2,51±0,11	0,45±0,04*	0,78±0,06**	0,87±0,06**	1,58±0,07**

выше, чем при раздельном их применении, — соответственно в 2,0 и 1,82 раза ($p < 0,05$).

Коэффициент SH/SS при развитии диабета снижался в сравнении с исходным значением в 2,6 раза, в то время как снижение коэффициента для АК составило 3,9 раза (рис. 1). Под влиянием ДСИП коэффициент SH/SS увеличивался в сравнении с таковым у животных с диабетом без лечения на 33,8 %, в то время как для АК увеличение составило 75,8 %. Аналогичное увеличение исследуемых показателей в условиях применения ЭС мозжечка составило 68,2 и 68,5 % соответственно. При сочетанном применении ДСИП и ЭС мозжечка возрастание коэффициента SH/SS в сравнении с таковым у крыс с диабетом в отсутствие лечения составило 2,2 раза, а коэффициент для АК — 2,5 раза (см. рис. 1). Оба исследуемых коэффициента вместе с тем оставались меньшими в сравнении с показателями у крыс группы контроля — на 14,9 и 36,7 % соответственно.

Таким образом, представленные результаты показали, что СТЦ-вызванный диабет сопровождается уменьшением антиоксидантного потенциала в ткани сетчатой оболочки — уменьшаются уровень тиоловых групп, общее содержание АК, а также содержание редуцированной формы АК. Эти результаты в целом согласуются с данными [7; 10] и свидетельствуют о патогенетическом значении истощения окислительно-восстановительных тиол-дисульфидной и аскорбатной систем в патогенезе диабетической ретинопатии.

С другой стороны, как ДСИП, так и ЭС мозжечка обеспечивают эффект увеличения продукции тиоловых групп, уменьшают содержание окисленных форм АК. Учитывая тот момент, что АК в основном поступает с пищей и в организме некоторых животных (например морских свинок) вообще не синтезируется

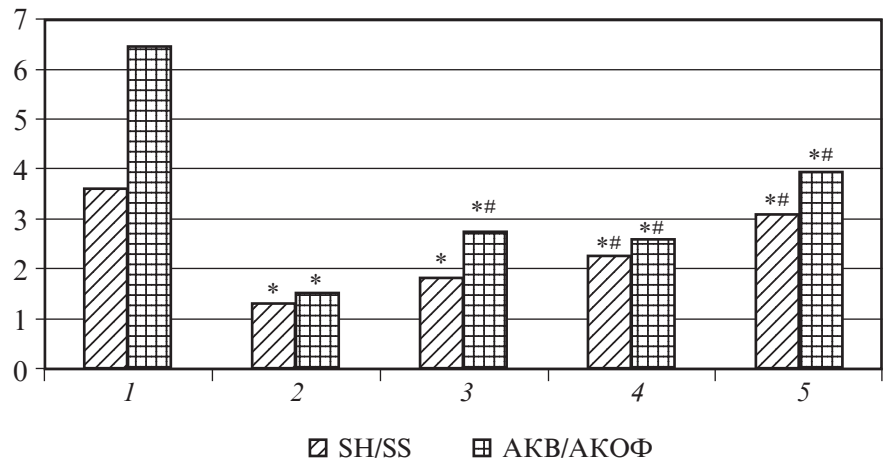


Рис. 1. Изменение соотношения восстановленных и окисленных форм тиол-дисульфидной и аскорбатной систем у диабетических крыс с различными методами лечения: 1 — интактные животные; 2 — введение СТЦ; 3 — применение ДСИП; 4 — ЭС мозжечка; 5 — ЭС мозжечка + ДСИП; АКВ — аскорбиновая кислота восстановленная; АКОФ — аскорбиновая кислота, окисленные формы; * — $p < 0,05$ в сравнении с показателем в группе контроля (интактные животные); # — $p < 0,05$ в сравнении с показателями у животных с моделированным сахарным диабетом

ся [7], даже в условиях сочетанного применения ДСИП и ЭС мозжечка не отмечается значительного увеличения уровня восстановленной АК, когда показатель соотношения восстановленной и окисленной форм АК остается на одну треть меньшим в сравнении с таковым в группе интактных животных. Предполагается, что механизм увеличения уровня АК может заключаться в том числе в общем повышении антиоксидантного потенциала и снижении использования АК на нейтрализацию перекисных соединений. Следует заметить, что АК оказывает антиоксидантное действие путем взаимодействия с редуцированным глутатионом или витамином E [7].

Вместе с тем, уровень восстановленного глутатиона возрастал в сравнительно большей степени и исследуемый показатель — соотношение SH/SS практически возвращалось к значению, которое отмечалось у интактных животных в сравнении с соответствующим коэффициентом для АК.

Полученные результаты создают перспективу применения ДСИП и транскраниальных

стимуляций поверхности мозжечка в комплексном лечении пациентов, страдающих диабетической ретинопатией.

Выводы

1. Развитие экспериментального сахарного диабета, вызванного применением стрептозотоцина у крыс, сопровождается снижением количества восстановленных тиоловых групп, а также аскорбиновой кислоты в ткани сетчатой оболочки глаза.

2. Применение дельта-сон индуцирующего пептида и электрических стимуляций палеоцереbellарной коры (100–300 Гц) у животных с экспериментальным диабетом вызывает потенцированный эффект снижения выраженности сдвигов тиол-дисульфидной и аскорбатной окислительно-восстановительных систем сетчатой оболочки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боднар П. М. Актуальні питання діагностики та лікування цукрового діабету / П. М. Боднар, Г. П. Михальчишин // Мистецтво лікування. — 2003. — № 1. — С. 51–55.

2. Моделирование и механизмы подавления экспериментального эпилептического синдрома / Л. С. Годлев-

ский, Е. В. Кобелев, В. Ф. Мустьяца, Г. А. Дроздова. – Одесса, 2010. – 350 с.

3. *Механизм реализации гепатопротекторной активности дельта-сон индуцирующего пептида* / Т. И. Бондаренко, И. И. Михалева, И. А. Прудченко, Е. А. Майборода // *Успехи геронтологии*. – 2011. – № 1. – С. 80–92.

4. *Регуляция дельта-сон индуцирующим пептидом перекисного окисления липидов в мозге крыс при холодном стрессе* / И. И. Михалева, Н. П. Милютин, Т. И. Бондаренко, Т. А. Шустанова // *Нейрохимия*. – 1999. – № 3. – С. 218–225.

5. *Соколовский В. В.* Тиосульфидное соотношение крови как показате-

тель состояния специфической резистентности организма / В. В. Соколовский. – СПб., 1996. – 33 с.

6. *Cariello A.* The emerging challenge in diabetes: the metabolic memory / A. Cariello // *Vascular Pharmacology*. – 2012. – Vol. 57, N 5/6. – P. 133–138.

7. *Deutch J. C.* Ascorbic acid oxidation by hydrogen peroxide / J. C. Deutch // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1998. – Vol. 255. – P. 1–7.

8. *Retinal glutamate in diabetes and effect of antioxidants* / R. A. Kowluru, R. L. Engerman, G. L. Case, T. S. Kern // *Neurochem. Internat.* – 2011. – Vol. 38, Issue 5. – P. 385–390.

9. *Protective effect of electrical stimulating cerebellar fastigial nucleus on ischemia and reperfusion-injury of retina*. Article in Chinese / A. D. Ding, H. Zhang, J. M. Wang [et al.] // *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. – 2004. – Vol. 40, N 6. – P. 400–403.

10. *Short-term ascorbic acid deficiency induced oxidative stress in the retinas of young Guinea pigs* / Y. Ohta, T. Okubo, T. Niwa [et al.] // *J. Biomed. Sci.* – 2004. – Vol. 11 (2). – P. 172–178.

11. *Weikel K. A.* Nutritional modulation of age-related macular degeneration / K. A. Weikel, C. J. Chiu, A. Taylor // *Molecular Aspects of Medicine*. – Vol. 33, N 4. – 2012. – P. 318–375.

УДК 616.43;616-008.9;616.39

Н. В. Кресюн

АНТИОКСИДАНТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СЕТЧАТОЙ ОБОЛОЧКИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИАБЕТЕ В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ ДЕЛЬТА-СОН ИНДУЦИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА И ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИИ ПАЛЕОЦЕРЕБЕЛЛУМА

У крыс линии Вистар применением стрептозотоцина (СТЦ) в дозе 50,0 мг/кг, в/бр вызывали сахарный диабет (уровень глюкозы в крови превышал 300 ммоль/л). Через две недели с момента применения СТЦ на протяжении двух недель вводили дельта-сон индуцирующий пептид (50,0 мкг/кг, в/бр) однократно ежедневно и проводили электрические стимуляции (100–300 Гц) палеоцеребеллярной коры два раза в сутки ежедневно, что вызывало потенцированный эффект — снижение количества восстановленных тиоловых групп и аскорбиновой кислоты в ткани сетчатой оболочки крыс с СТЦ-индуцированным диабетом.

Ключевые слова: стрептозотозин, диабетическая ретинопатия, дельта-сон индуцирующий пептид, электрическая стимуляция мозжечка, антиоксиданты.

UDC 616.43;616-008.9;616.39

N. V. Kresyun

ANTIOXIDATIVE MECHANISMS OF RETINA IN EXPERIMENTAL DIABETES AND EFFECTS OF TREATMENT WITH DELTA-SLEEP INDUCING PEPTIDE AND PALEOCEREBELLAR ELECTRICAL STIMULATION

Streptozotocin (STC) (50.0 mg/kg, i. p.) diabetes was induced in Wistar rats glucose level higher than 300 mmol/l. In two weeks from the moment of STC administration treatment with delta-sleep inducing peptide (DSIP) (50.0 mcg/kg, i. p., daily) as well as treatment with electrical stimulation (ES) (100–300 Hz, twice per day) of paleocerebellar cortex started and lasted during two next weeks. Combined usage of DSIP and paleocerebellar ES caused potentiated elevation of thiol groups and reduced ascorbic acid in retina of rats with STC-induced experimental diabetes.

Key words: streptozotocin, diabetes retinopathy, delta-sleep inducing peptide, cerebellar electrical stimulation, antioxidants.

УДК 616.33-002.44-084

Т. М. Муратова, канд. мед. наук, доц.

ВПЛИВ ЕЛЕКТРИЧНОЇ СТИМУЛЯЦІЇ ПАЛЕОЦЕРЕБЕЛЯРНОЇ КОРИ ТА ЛЕВЕТИРАЦЕТАМУ НА ПОВЕДІНКУ АКТИВНОГО УНИКНЕННЯ ЩУРІВ

Одеський національний медичний університет

Результати клінічних досліджень свідчать про значні порушення когнітивної функції, формування психозоподібних станів у пацієнтів з морфофункціональними порушеннями з боку мозочка [9]. Установлено, що транскраніальні стимуляції мозочка за допомогою імпульсів магнітного поля високої індукції сприяють покращанню

когнітивної функції хворих на шизофренію [10]. Можна вважати, що мозочок забезпечує не тільки власне моторні функції, а й відіграє важливу роль в емоційній поведінці, забезпечує реалізацію когнітивних функцій мозку [3]. До останнього часу не досліджувались особливості реакції активного уникнення щурів за умов штучної

активації палеоцеребеллярної кори.

Метою дослідження було вивчення особливостей викликаного максимальним електрошоком пригнічення активного уникнення у щурів за умов електричної стимуляції (ЕС) старої кори мозочка, а також за умов застосування леветирацетаму (ЛВР) — протиепілептичного засобу,