

Н. В. Кресюн

ЕЛЕКТРОРЕТИНОГРАФІЧНІ ЗМІНИ У ЩУРІВ ЗІ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНИМ ДІАБЕТОМ ЗА УМОВ ВИКОРИСТАННЯ АЛЬФА-ЛІПОЄВОЇ КИСЛОТИ І АВАСТИНУ

Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

УДК 616.62-008.61-07-08

Н. В. Кресюн

ЭЛЕКТРОРЕТИНОГРАФИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ У КРЫС СО СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННЫМ ДИАБЕТОМ В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ АЛЬФА-ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ И АВАСТИНА

Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина

Цель исследования — изучение показателей электроретинограммы (ЭРГ) у крыс с моделированным применением стрептозотоцина сахарным диабетом и особенностей ЭРГ в условиях лечения с применением альфа-липовой кислоты и авастина.

У крыс линии Вистар моделировали диабет введением стрептозотоцина (50,0 мг/кг, в/бр). Через полмесяца и в течение последующих двух месяцев ежедневно применяли альфа-липоевую кислоту (20,0 мг/кг, в/бр) и авастин (0,5 мг, внутривитреально, один раз в месяц), после чего регистрировали ЭРГ.

Установлено, что латентный период β -волны возрастал на 10,4 % при снижении амплитуды в 2,24 раза по сравнению с интактными крысами ($P < 0,05$). Латентный период α -волны был на 25,1 % большим ($P < 0,05$), а скорость изменения ее амплитуды в 2,47 раза меньшей ($P < 0,05$). Латентный период осцилляторных потенциалов W_2 и W_3 увеличивался на 42,5 и 42,8 % ($P < 0,05$), в то время как их амплитуда уменьшалась в 5,0 и 3,37 раза соответственно в сравнении с интактными крысами ($P < 0,05$). Применение альфа-липоевой кислоты вызывало увеличение амплитуды β -волны на 45,5 % ($P < 0,05$), а также амплитуды W_3 в 1,4 раза ($P < 0,05$). На фоне введенный авастин подобное лечение увеличивало амплитуду β -волны, которая была больше таковой у крыс с применением альфа-липоевой кислоты на 32,8 % ($P < 0,05$). Кроме того, увеличивалась скорость изменения амплитуды α -волны в 2,2 раза в сравнении с нелечеными крысами ($P < 0,05$), уменьшался латентный период W_2 на 28,1 % ($P < 0,05$) с одновременным увеличением амплитуды в 3,3 раза и редукцией латентного периода W_3 на 24,6 % ($P < 0,05$) при увеличении амплитуды в 2,2 раза ($P < 0,05$).

Полученные результаты показали, что развитие стрептозотоцин-индуцированного диабета сопровождается увеличением латентности и снижением амплитуды волн α - и β -, а также осцилляторных потенциалов W_2 и W_3 . Применение альфа-липоевой кислоты снижает указанные нарушения, и корригирующий эффект усиливается на фоне внутривитреального применения авастина.

Ключевые слова: стрептозотоцин, диабетическая ретинопатия, альфа-липоевая кислота, авастин.

UDC 616. 62-008. 61-07-08

N. V. Kresyun

ELECTRORETINOGRAPHIC DETERIORATIONS IN RATS WITH STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES UNDER CONDITION OF TREATMENT WITH ALPHA-LIPOIC ACID AND AVASTIN

The Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine

Introduction. Diabetic retinopathy pathogenesis includes mechanisms of the deterioration of retinal neurons activity, which is expressed in electroretinographic (ERG) manifestations. It is reasonable to register ERG in diabetic rats under condition of treatment with antioxidants and anti-VEGF drug.

The aim was to investigate the ERG peculiarities in rats with streptozotocin-induced diabetes under conditions of treatment with alpha-lipoic acid and avastin.

Methods of investigations. In Wistar rats diabetes have been modeled via i. p. streptozotocin administration (50.0 mg/kg, i. p.). In 0.5 months from the moment of streptozotocin injection and during next two months treatment with alpha-lipoic acid (20.0 mg/kg, i. p., daily) and avastin (0.5 mg, intravitreally, monthly) started with the consequent ERG registration.

Results. The increase of latency of β -wave in ERG by 10.4% along with the reduction of its amplitude 2.24 times pertained to intact rats was seen in diabetic animals ($P < 0.05$). At the same time the latency of α -wave was greater by 25.1% ($P < 0.05$), while the dynamics of its amplitude was slower 2.47 times ($P < 0.05$). The oscillatory potentials W_2 and W_3 latency increased by 42.5% and 42.8% ($P < 0.05$), while their amplitude were reduced 5.0 and 3.37 times correspondently when compared to control group ($P < 0.05$). Treatment with alpha-lipoic acid was followed by the increase of β -wave amplitude by 45.5% ($P < 0.05$), while the amplitude of W_3 increased 1.4 times ($P < 0.05$). The same treatment combined with avastin was resulted in the increasing of β -wave amplitude, which exceeded that one registered in alpha-lipoic-treated rats by 32.8% ($P < 0.05$), increasing of the dynamic of amplitude of α -wave 2.2 times pertained to diabetic rats ($P < 0.05$), decreasing of the latency



of W_2 by 28.1% ($P < 0.05$) with the increasing of its amplitude 3.3 times and the reduction of the W_3 latency by 24.6% ($P < 0.05$), along with the increasing of its amplitude 2.2 times ($P < 0.05$).

Conclusions: streptozotocin-induced diabetes is followed by ERG deterioration mainly manifested in the increase of latency and reduction of amplitude of α -, β -waves, and oscillatory W_2 and W_3 potentials. Treatment with alpha-lipoic acid prevented diabetes-induced deterioration and this effect is more pronounced under condition of simultaneous treatment with avastin.

Key words: streptozotocin, diabetic retinopathy, electroretinogram, alpha-lipoic acid, avastin.

Вступ

В умовах формування експериментального цукрового діабету, викликаного застосуванням стрептозотоцину (СТЗ), спостерігається збільшення продукції переокисних сполук, які викликають порушення діяльності ретинальних нейронів та їх дегенеративні зміни [1; 2]. Одним із проявів подібних порушень є виникнення ретинопатії, яка супроводжується характерними проявами на електроретинограмі (ЕРГ) [3; 4; 9]. Разом з тим, не вивчалася ефективність поєданого використання антиоксидантів і препаратів, які запобігають проліферації та утворенню нових капілярів у мікроциркуляторному руслі сітківки ока за умов експериментального цукрового діабету.

Метою цього дослідження було вивчення показників ЕРГ у щурів із СТЗ-індукованим діабетом за умов використання альфа-ліпоєвої кислоти, яка має антиоксидантну дію, і авастину — препарату, що містить антитіла до фактору росту ендотелію судин — VEGF [6].

Матеріали та методи дослідження

Дослідження виконано за умов хронічного експерименту на щурах-самцях лінії Вістар масою 170–240 г, яких утримували за стандартних умов віварію ОНМедУ. Дослідження було проведено у відповідності до вимог GLP та комісії з біоетики ОНМедУ (протокол № 84 від 10 жовтня 2008 р.).

Експериментальний цукровий діабет викликали в/очер застосуванням СТЗ дозою 50,0 мг/кг ("Sigma Aldrich.ru", Москва), який розчиняли в бу-

ферному натрієво-цитратному розчині (рН 4,5). Через один та два тижні з моменту застосування СТЗ у венозній крові щурів, яку отримували з вени хвоста, визначали вміст глюкози і в подальших спостереженнях використовували тварин, у яких цей показник становив більше 300 мг/л [3]. Вміст глюкози визначали о 9.00 за умов вільного доступу до їжі протягом ночі. Під час усього спостереження експериментальним тваринам вводили інсулін (0–2 ОД підшкірно два-п'ять разів на тиждень) [3].

Щурів розподілили на такі групи:

1) контроль — інтактні щури (10 тварин);

2) щури з цукровим діабетом без лікування (12 тварин);

3) щури з діабетом, яким щодоби вводили ліпоєву кислоту («Солгар Витамин и Херб», США; 20,0 мг/кг, в/очер) протягом 2 міс. (10 тварин);

4) щури, яким щодоби вводили ліпоєву кислоту (20,0 мг/кг, в/очер) протягом 2 міс., а також виконували внутрішньовитреальне введення авастину ("F. Hoffmann-La Roche Ltd.", Швейцарія; один раз на місяць дозою 0,5 мг введення; 11 тварин).

Електроретинограму реєстрували за методом [9]. Відповідно до методики тварин утримували за умов повної темряви протягом 12 год і за умов галотанового наркозу (2,0 % галотану та 98,0 % кисню), а також кетамінового наркозу (100,0 мг/кг, в/очер). В екранованій камері здійснювали фотостимуляцію за допомогою світлодіодного стимулятора (Grass PS 22), який спрямовували паралельно до оптичної осі ока за допомогою оптово-

локонного світловоду діаметром 7,0 мм. На поверхні рогики ока розташовували реєструючий електрод, а як індиферентний електрод використовували металеві ретрактори, якими роз'єднували повіки. Реєстрацію ЕРГ здійснювали на комп'ютерному електроенцефалографі «DX-4000-practic» (Харків, Україна). Усі зареєстровані відповіді оцифровувалися при частоті дискретизації 256 Гц і глибині кодування 12 біт. Записували отримані результати на жорсткий диск і проводили аналіз у відкладеному в часі режимі. При цьому визначали показники латентного періоду і амплітуди α - і β -хвиль, а також осциляторних потенціалів W_2 та W_3 [4; 9].

Результати дослідження обробляли за допомогою методу ANOVA і статистичного тесту Newman-Keuls.

Результати дослідження та їх обговорення

Проведені дослідження засвідчили, що амплітуда β -хвилі у щурів із СТЗ-індукованим діабетом була в 2,24 разу меншою порівняно з показником у щурів групи контролю ($P < 0,05$) (табл. 1). Крім того, розвиток цукрового діабету характеризувався збільшенням тривалості латентного періоду α -хвилі на 25,1 % ($P < 0,05$), а також латентного періоду β -хвилі на 10,4 % ($P < 0,05$). Характерними були також зміни швидкості декременту α -хвилі, яка зменшувалася порівняно з показником у групі контролю в 2,47 разу ($P < 0,05$). Крім того, у експериментальних тварин реєструвалися зміни характеристик осциляторних потенціалів W_2 та W_3 , латентний період розвитку яких збільшувався відповідно на 42,5 та



Показники електроретинографічного дослідження щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом за різних умов експериментального лікування, M+m

Показник	Інтактні щури, n=10	СТЗ-індукований діабет, n=12	СТЗ-індукований діабет + лікування	
			Альфа-ліпоєва кислота, n=10	Альфа-ліпоєва кислота + авастин, n=11
Амплітуда β -хвилі, мкВ	437,2 \pm 22,8	195,3 \pm 14,2*	284,2 \pm 17,5*#	377,5 \pm 21,4#
Латентний період α -хвилі, мс	27,9 \pm 1,1	34,9 \pm 1,7*	33,1 \pm 1,8	29,3 \pm 2,7#
Латентний період β -хвилі, мс	67,3 \pm 1,8	74,3 \pm 1,9*	71,5 \pm 2,3	69,0 \pm 1,6
Швидкість зміни амплітуди α -хвилі, мкВ/мс	-30,1 \pm 2,7	-12,2 \pm 1,1*	-16,7 \pm 1,2*	-27,2 \pm 1,8#
Осциляторні потенціали				
Латентний період потенціалу W_2 , мс	30,6 \pm 1,2	43,5 \pm 2,2*	40,7 \pm 1,6*	31,3 \pm 1,3#
Латентний період потенціалу W_3 , мс	39,5 \pm 1,4	56,4 \pm 2,7*	50,7 \pm 2,5*	42,5 \pm 1,7#
Амплітуда потенціалу W_2 , мкВ	67,2 \pm 4,8	13,4 \pm 1,0*	19,6 \pm 1,2*#	44,8 \pm 3,6*#
Амплітуда потенціалу W_3 , мкВ	85,3 \pm 5,1	25,3 \pm 2,2*	34,7 \pm 2,5*#	56,3 \pm 4,8*#

Примітка. * — $P < 0,05$ щодо показника в групі інтактних щурів; # — $P < 0,05$ щодо показника у щурів із СТЗ-індукованим діабетом за відсутності лікування (метод ANOVA + тест Newman–Keuls).

42,8 % ($P < 0,05$). Також суттєво зменшувалася амплітуда цих потенціалів — у 5,0 та в 3,37 рази щодо відповідних показників у групі контролю ($P < 0,05$).

У групі щурів, яким застосовували антиоксиданти, амплітуда β -хвилі була вищою, ніж у групі щурів із застосуванням СТЗ без лікування, на 45,5 % ($P < 0,05$) і одночасно залишалася меншою порівняно з показником у інтактних щурів на 35,0 % ($P < 0,05$). При цьому в групі із застосуванням антиоксидантів у поєднанні з авастинном досліджуваний показник перевищував такий, що реєструвався в групі з одним лише застосуванням антиоксидантів, на 32,8 % ($P < 0,05$) і залишався на 13,7 % меншим щодо аналогічного показника в інтактних щурів ($P > 0,05$).

Латентний період α -хвилі за умов застосування антиоксидантів залишався більш високим порівняно з інтактними щурами на 9,3 % ($P > 0,05$) і при цьому був зниженим порівняно з показником, який реєструвався у щурів із СТЗ-індукованим діабетом за відсутності лікування на 12,6 % ($P > 0,05$). При поєднаному використанні антиоксидантів і авастину до-

сліджуваний показник був вищим, ніж у інтактних щурів, на 1,1 % ($P > 0,05$) та залишався меншим, ніж у щурів з діабетом без лікування на 19,2 % ($P < 0,05$). Латентний період β -хвилі за умов використання антиоксидантів перевищував відповідний показник у групі інтактних щурів на 6,2 % і при цьому залишався меншим, ніж у щурів із СТЗ-індукованим діабетом за відсутності лікування, на 3,8 % ($P > 0,05$). Тим же часом, при поєднаному застосуванні антиоксидантів і авастину латентний період β -хвилі зменшувався порівняно з показником у групі з використанням СТЗ за відсутності лікування на 7,1 % ($P > 0,05$).

Швидкість зміни амплітуди α -хвилі під впливом антиоксидантів зростала порівняно з показником у групі щурів з діабетом без лікування на 36,9 % ($P > 0,05$) і при цьому залишалася меншою щодо показника у групі інтактних щурів на 44,5 % ($P < 0,05$). Водночас за умов поєднаного застосування антиоксидантів й авастину досліджуваний показник був більшим, ніж у групі нелікованих щурів, у 2,2 рази ($P < 0,05$), а щодо аналогічного показника в ін-

тактних щурів залишався нижчим на 9,7 % ($P > 0,05$).

Дослідження характеристик осциляторних потенціалів засвідчило, що латентний період W_2 у групі тварин з використанням антиоксидантів був меншим, ніж у щурів із застосуванням СТЗ за відсутності лікування, на 6,4 % ($P > 0,05$) і залишався при цьому більшим порівняно з показником у інтактних щурів на 33,0 % ($P < 0,05$). За умов поєднаного застосування антиоксидантів й авастину латентний період зменшувався щодо показника у нелікованих щурів на 28,1 % ($P < 0,05$) і був більшим за аналогічний показник у групі інтактних щурів на 2,3 % ($P > 0,05$).

Латентний період виникнення потенціалу W_3 у групі щурів із використанням антиоксидантів зменшувався порівняно з показником у нелікованих щурів на 10,1 % ($P > 0,05$) і залишався при цьому більшим, ніж у інтактних щурів, на 28,4 % ($P < 0,05$). За умов поєднаного застосування антиоксидантів і авастину досліджуваний показник зменшувався порівняно з показником у нелікованих щурів на 24,6 % ($P < 0,05$) і перевищував показник у інтактних щурів на 7,6 % ($P > 0,05$). Слід

зазначити, що вказаний показник був меншим, ніж у групі з одним лише застосуванням антиоксидантів, на 16,2 % ($P > 0,05$).

За умов використання антиоксидантів амплітуда W_2 збільшувалася порівняно з показником у нелікованих щурів на 46,3 % ($P > 0,05$) і при цьому залишалася меншою в 3,4 разу, ніж у інтактних щурів ($P < 0,05$). Під впливом поєднаного застосування антиоксидантів і авастину амплітуда потенціалу W_2 зростала в 3,3 разу порівняно з показником у нелікованих щурів ($P < 0,05$), але була меншою, ніж у інтактних щурів, на 33,7 % ($P < 0,05$). При цьому спостерігалися достовірні відмінності з групою щурів із одним тільки використанням антиоксидантів, у яких досліджуваний показник був в 2,3 разу меншим ($P < 0,05$).

Амплітуда потенціалу W_3 у щурів із застосуванням антиоксидантів зростала порівняно з показником у нелікованих щурів в 1,4 разу ($P < 0,05$) і залишалася при цьому в 2,5 разу меншою порівняно з показником у інтактних щурів ($P < 0,05$). При поєднаному застосуванні антиоксидантів і авастину величина досліджуваного потенціалу збільшувалася порівняно з показником у групі нелікованих тварин в 2,2 разу ($P < 0,05$) і при цьому була також меншою, ніж у інтактних щурів, на 34,0 % ($P < 0,05$).

Таким чином, отримані результати засвідчили, що за умов формування СТЗ-індукованого діабету у щурів спостерігалися порушення ЕРГ-показників. Так, зокрема, реєструвалося подовження латентності β -хвилі, зменшення її амплітуди, швидкість зміни амплітуди α -хвилі також суттєво зменшувалася. Крім того, осциляторні потенціали W_2 та W_3 характеризувалися збільшенням латентного періоду їх виникнення та зменшенням амплітуди. Подібні порушення відповідають типовому характеру їх

виникнення за умов відтворення СТЗ-індукованого діабету [3; 4; 7]. В основі подібних порушень можуть знаходитися викликані надмірною продукцією вільних радикалів зниження функції нейронів, демієлінізація аксонів нейронів, а також дегенеративні зміни з боку самих нейронів. Типовий характер патогенетичних механізмів зумовлює подібні порушення викликаних потенціалів у кірковій зоні зорового аналізатора [4].

Застосування альфа-ліпоєвої кислоти, яка спричинює підвищення внутрішньоклітинного синтезу глутатіону [8], запобігає виникненню відповідних порушень з боку ЕРГ-показників у щурів з модельованим цукровим діабетом. Цей факт вказує на патогенетичну роль саме надмірної продукції перекисних сполук у виникненні відповідних порушень.

З другого боку, застосування антиоксидантної терапії на тлі використання авастину, який призводить до зменшення вмісту фактора росту судин VEGF [5], супроводжувалося потенціюванням позитивних терапевтичних впливів. Подібні ефекти потенціювання можуть пояснюватися здатністю авастину запобігати нейродегенеративним змінам, які виникають при надмірній проліферації судин мікроциркуляторного русла [6].

Висновки

1. Розвиток ретинопатії за умов відтворення стрептозоточин-індукованого діабету характеризується подовженням латентного періоду та зменшенням амплітуди β -хвилі, зниженням швидкості зміни амплітуди α -хвилі, а також збільшенням латентності та зменшенням амплітуди осциляторних потенціалів W_2 та W_3 .

2. Застосування альфа-ліпоєвої кислоти (20,0 мг/кг, в/очер) запобігає діабет-провокованим електроретинографічним проявам, і цей ефект

посилюється внутрішньовітральним застосуванням авастину (0,5 мг).

ЛІТЕРАТУРА

1. Антиоксидантний ефект природних поліфенольних комплексів винограду у сітківці ока щурів із цукровим діабетом, індукованим стрептозоточином / А. Р. Гнатуш, В. Р. Дрель, А. Я. Яланецький [та ін.] // *Studii Biologica*. – 2011. – Т. 5, № 2. – С. 61–72

2. Кресюн Н. В. Патологіологічні механізми формування діабетичної ретинопатії та обґрунтування підходів до її терапії / Н. В. Кресюн // *Інтегративна антропологія*. – 2013. – № 1 (21). – С. 43–48.

3. *Acetyl-L-carnitine* corrects electretinographic deficits in experimental diabetes / S. Lowitt, J. I. Malone, A. Salem [et al.] // *Diabetes*. – 1993. – Vol. 42. – P. 1115–1118.

4. *An electrophysiological method for detecting diabetic retinopathy in rats* / S. Sato, S. Sugimoto, T. Ando, H. Miyajima // *Chiba Folia Pharmacologica Japonica*. – 1984. – Vol. 84, N 6. – P. 509–517.

5. *Antioxidant or neurotrophic factor treatment preserves function in a mouse model of neovascularization-associated oxidative stress* / M. I. Dorell, E. Aguilar, R. Jacobson [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2009. – Vol. 119, N 3. – P. 611–623.

6. *Avastin treatment reduces retinal neovascularization in a mouse model of retinopathy of prematurity* / R. Rabino-witz, A. Priel, M. Rosner [et al.] // *Curr. Eye Res.* – 2012. – Vol. 37, N 7. – P. 624–629.

7. *Development of electretinographic alterations in streptozotocin-induced diabetes in rats* / H. Sakai, Y. Tani, E. Shirasawa [et al.] // *Ophthalmic Res.* – 1995. – Vol. 27. – P. 57–63.

8. *Glutathione and alpha-lipoate in diabetic rats: nerve function, blood flow and oxidative state* / P. S. van Dam, B. S. van Asbeck, J. F. Van Oirschot [et al.] // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2001. – Vol. 31, N 5. – P. 417–424.

9. *Kozak W. M. Quantitative electretinography in rats* / W. M. Kozak, L. G. Deneault, J. F. Osborn // *Doc. Ophthalmol. Proc. Ser.* – 1982. – Vol. 31. – P. 59–65.

REFERENCES

1. Gnatush A.R., Drel V.R., Yalanetsky A.Ya. et al. Antioxidant effect of natural grape polyphenol complexes in retina of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Studii Biologica. Studii Biologica* 2011; 5 (2): 61-72



2. Kresyun N.V. Pathophysiological mechanisms of diabetic retinopathy formation as a basis of the approaches to its treatment. *Integrative Anthropology* 2013; 1 (21): 43-48.

3. Lowitt S., Malone J.I., Salem A. et al. Acetyl-L-carnitine corrects electroretinographic deficits in experimental diabetes. *Diabetes* 1993; 42: 1115-1118.

4. Sato S., Sugimoto S., Ando T., Miyajima H. An electrophysiological method for detecting diabetic retinopathy in rats. *Chiba Folia Pharmacologica Japonica* 1984; 84 (6): 509-517.

5. Dorrell M.I., Aguilar E., Jacobson R. et al. Antioxidant or neurotrophic factor treatment preserves function in a mouse model of neovascularization-associated oxidative stress. *J Clin Invest* 2009; 119 (3): 611-623.

6. Rabinowitz R., Priel A., Rosner M. et al. Avastin treatment reduces retinal neovascularization in a mouse model of retinopathy of prematurity. *Curr. Eye Res* 2012; 37 (7): 624-629.

7. Sakai H., Tani Y., Shirasawa E. et al. Development of electroretinographic alterations in streptozotocin-

Induced diabetes in rats. *Ophthalmic Res* 1995; 27: 57-63.

8. Van Dam P.S., Van Asbeck B.S., Van Oirschot J.F. et al. Glutathione and alpha-lipoate in diabetic rats: nerve function, blood flow and oxidative state. *Eur. J. Clin. Invest* 2001; 31 (5): 417-424.

9. Kozak W.M., Deneault L.G., Osborn J.F. Quantitative electroretinography in rats. *Doc. Ophthalmol. Proc. Ser* 1982; 31: 59-65.

Надійшла 10.04.2014

Передплачуйте
і читайте



ОДЕСЬКИЙ МЕДИЧНИЙ ЖУРНАЛ

Передплата приймається у будь-якому передплатному пункті

Передплатний індекс 48717

У випусках журналу:

- ◆ Теорія і експеримент
- ◆ Клінічна практика
- ◆ Профілактика, реабілітація, валеологія
- ◆ Новітні технології
- ◆ Огляди, рецензії, дискусії

