

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Кресюн Н.В., 2013  
УДК: 663.2: 617.735: 616.831.711

**АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗЫ И ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗЫ  
В СЕТЧАТОЙ ОБОЛОЧКЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ  
ДИАБЕТЕ И ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ СТАРОЙ КОРЫ  
МОЗЖЕЧКА**

*Н.В. КРЕСЮН*

Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина

**GLUTATHIONE PEROXIDASE AND GLUTATHIONE REDUCTASE  
ACTIVITY IN RETINA UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL  
DIABETES AND PALEOCEREBELLAR ELECTRICAL STIMULATION**

*N.V. KRESYUN*

Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine

*У крыс линии Вистар в/бр применением стрептозотоцина (50,0 мг/кг) моделировали сахарный диабет. Через 1,5 месяца с момента применения стрептозотоцина активность глутатионпероксидазы уменьшилась на 42,0% и глутатионредуктазы – на 33,0% в сравнении с соответствующими показателями у интактных крыс. Электрические стимуляции (ЭС) (100 Гц) палеоцереbellарной коры мозжечка (V-VII дольки), осуществляемые в течение месяца трижды в сутки предотвращали эффект снижения активности антиоксидантных ферментов у крыс с экспериментальным диабетом.*

*Ключевые слова: стрептозотоцин, диабетическая ретинопатия, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, электрическая стимуляция мозжечка.*

*The model of sugar diabetes was induced in Wistar rats via i.p. streptozotocin (50,0 mg/kg) administration. In 1,5 months from the moment of streptozotocin the activity of glutathione peroxidase was reduced by 42,0% and such one of glutathione reductase – by 33,0% when compared with corresponded data in intact rats. Electrical*

*cal stimulations (ES) (100 Hz) of paleocerebellum (V-VII lobules), which have been delivered during months three times per day effectively prevented the diabetes-induced reduction of activity of antioxidant enzymes.*

*Key words: streptozotocin, diabetes retinopathy, glutathioneperoxidase, glutathionereductase, electrical stimulation of cerebellum.*

Диабетическая ретинопатия (ДР) представляет собой результат комплексного поражения сетчатой оболочки глаза и ее сосудов, что является следствием диабетической капиллярнопатии [3, 4]. Одним из ведущих патогенетических механизмов возникновения и развития ДР является активирование перекисного окисления липидов, появление пероксинитрита, как результата вовлечения эндогенной системы оксида азота в патогенез имеющих место нарушений [3]. Поэтому применение антиоксидантов может представлять собой одно из патогенетически оправданных лечебных мероприятий при сахарном диабете, в том числе направленное против формирования осложнений таких как ДР [3, 4].

Было установлено, что применение электрических стимуляций (ЭС) ядра шатра мозжечка обеспечивает нейропротекторное действие в отношении индуцированных ишемией повреждений сетчатой оболочки у крыс [5]. Причем, одним из возможных ме-

ханизмов формирования подобных корригирующих влияний было антиоксидантное действие [1].

Поэтому целью настоящего исследования было изучение особенностей активности антиоксидантных ферментов – глутатионпериоксидазы (ГПО) (КФ 1.11.1.9) и глутатионредуктазы (ГР) (КФ 1.8.1.7) у крыс в условиях моделирования сахарного диабета применением стрептозотоцина (СТЗ), а также динамики этих показателей в условиях применения ЭС палеocerebellарной коры мозжечка.

### **Материал и методы**

Исследования выполнены в условиях хронического эксперимента на крысах-самцах линии Вистар, которые содержались в стандартных условиях вивария ОНМедУ. Исследования проводили в соответствии с требованиями GLP и комиссии биоэтики ОНМедУ (протокол № 84 от 10 октября 2008 г.). На каждые третьи сутки осуществляли взвешивание животных.

Под кетаминным наркозом (100,0 мг/кг, в/бр) животным имплантировали биполярные нихромовые электроды (межэлектродное расстояние 0,25-0,3 мм) в дольки V-VII палеоцеребеллярной коры, которые крепили к поверхности черепа с помощью быстротвердеющей зубопротезной пластмассы типа «Норакрил». Животных наблюдали, начиная с 7-10-х суток с момента проведения оперативного вмешательства.

Экспериментальный сахарный диабет вызывали в/бр введением натощак СТЗ в дозе 50,0 мг/кг («Sigma Aldrich.ru» Москва), который растворяли в буферном натриево-цитратном растворе (рН 4,5).

Через одну и две недели с момента применения СТЗ у животных в венозной крови, которую получали из хвостовой вены, определяли содержание глюкозы, и в дальнейших наблюдениях использовали животных, у которых этот уровень составлял более 300 мг/л [4]. Определение содержания глюкозы проводили в 9.00, в условиях доступа животных пищи в течение ночного времени. В течение всего наблюдения животным применяли введения инсулина (0-2 ед п/к два – пять раз в неделю) [4].

Животных разделяли на пять групп: 1) контроль – интактные ложно оперированные крысы (11 животных); 2) интактные крысы, которым осуществляли ЭС палеоцеребеллярной коры (12 животных); 3) животные с сахарным диабетом без лечения (11 крыс); 4) крысы с диабетом, которым проводили ежедневные однократные ЭС палеоцеребеллярной коры (10 животных); 5) крысы, которым проводили ежедневные трехкратные ЭС палеоцеребеллярной коры (10 животных).

На 14-е сутки с момента применения СТЗ и на протяжении последующих четырех недель осуществляли ЭС палеоцеребеллярной коры через предварительно имплантированные электроды. ЭС проводили с помощью прямоугольных импульсов силой тока 80-120 мкА, частотой импульсов 100 Гц, длительностью ЭС 2,5 с. Всего использовали два режима ЭС: однократно ежедневно и трехкратно (9.00; 14.00; 19.00).

По окончании наблюдения осуществляли эвтаназию и у декапитированных животных удаленные ткани замораживали и хранили в жидком азоте. Выделенные ткани сетчатки промывали фосфатным буферным

раствором с целью удаления компонентов крови и гомогенизировали в 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,0) из расчета 1:10 (вес/ объем). Гомогенизированные образцы отцентрифугировали в течение 15 мин при 13000 об/мин при температуре + 4°C. Активность ГПО (GSH/мин/мг белка, нМ) определяли по [2] и ГР (NADPH/мин/мг белка, нМ) – по [7]. Концентрацию белка определяли по методу [9].

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

#### Результаты и их обсуждение

По окончании эксперимента масса тела крыс группы контроля увеличивалась в сравнении с исходным значением на 36,2% и составила  $297 \pm 18,3$  г. Увеличение массы тела крыс с ЭС мозжечка составило соответственно 29,3% и 27,0% при однократных ежедневных ЭС в сравнении с показателями, зарегистрированными до начала ЭС ( $P < 0,05$ ). В то же время, в группе крыс с диабетом без применения ЭС аналогичный показатель составил 10,7% ( $P > 0,05$ ). Во всех группах животных диабетом содержание глюкозы в крови превышало

соответствующий показатель у интактных животных в 3,3-4,4 раза ( $P < 0,05$ ).

Активность ГПО у интактных животных составила  $1,05 \pm 0,09$  нМ, в то время как у крыс с диабетом в отсутствие ЭС мозжечка этот показатель был меньшим на 42,0% ( $P < 0,05$ ) (рис. 1). Под влиянием ЭС мозжечка регистрировалось возрастание активности ГПО, величина которой при однократных и трехкратных ЭС превышала аналогичный показатель у крыс с диабетом в отсутствие ЭС соответственно на 42,6% и на 80,0% ( $P < 0,05$ ). Причем, в обеих группах исследуемый показатель не имел достоверных отличий в сравнении с показателем в группе интактных животных ( $P > 0,05$ ).

Активность ГР в ткани сетчатой оболочки крыс с диабетом в отсутствие ЭС мозжечка составила  $9,85 \pm 0,11$  нМ (рис. 2) и была на 33,0% меньше аналогичного показателя в группе интактных животных ( $P < 0,05$ ). Исследуемый показатель в группе крыс с диабетом, которым применяли однократные ЭС мозжечка был на 21,8% большим в сравнении с таковым у крыс с диабетом без ЭС ( $P > 0,05$ ) и при этом оставался меньшим в сравнении с показателем у интактных крыс на 18,4% ( $P > 0,05$ ). На

фоне более частых ЭС активность ГР возрастала в сравнении с показателем у диабетических крыс на 37,0% ( $P < 0,05$ )

и была на 8,2% меньше, чем у интактных животных ( $P > 0,05$ ) (рис. 2).

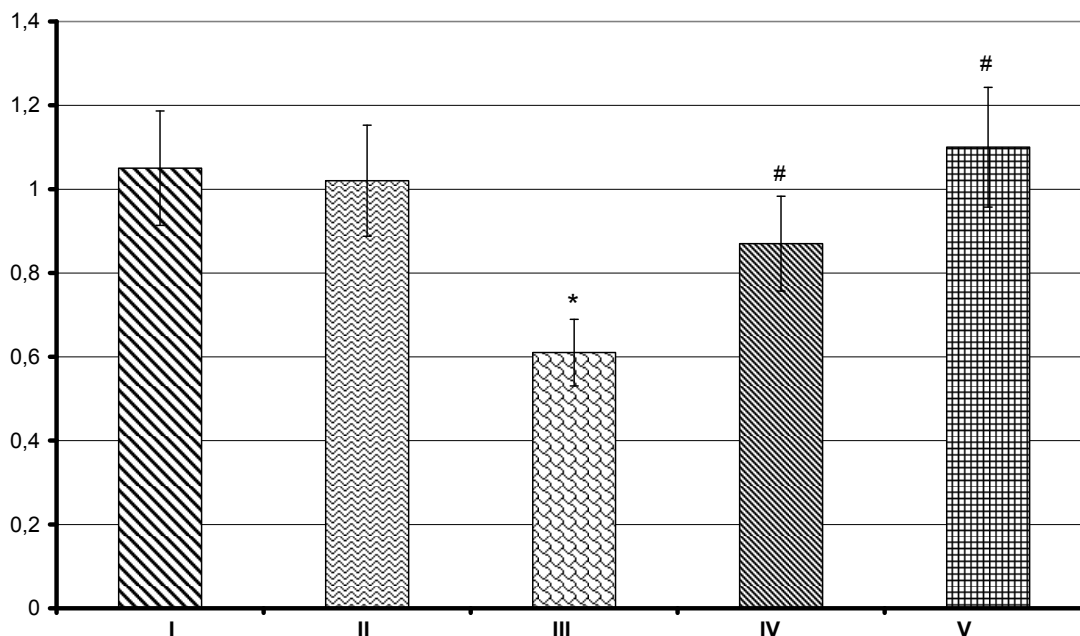


Рис. 1. Активность глутатинпероксидазы в ткани сетчатой оболочки глаза крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом в различных условиях лечения

По оси ординат: активность глутатинпероксидазы (GSH/мин/мг белка, нМ); по оси абсцисс – I- интактные крысы; II- интактные крысы с ЭС мозжечка ; III- крысы с экспериментальным диабетом; IV- СТЦ-вызванный диабет+ ЭС палеocerebellарной коры (один раз в сутки, две недели); V- СТЦ-вызванный диабет+ ЭС палеocerebellарной коры (три раза в сутки, две недели)

\*- $P < 0,05$  в сравнении с показателем в группе интактных крыс с ЭС мозжечка; #- $P < 0,05$  – в сравнении с показателем в группе крыс с экспериментальным диабетом в отсутствие лечения.

Полученные результаты, таким образом, показывают, что у крыс с экспериментальным диабетом, индуцированным применением стрептозо-

тоцина, в ткани сетчатой оболочки глаза наблюдаются выраженные изменения со стороны активности ферментов, обеспечивающих инактивацию

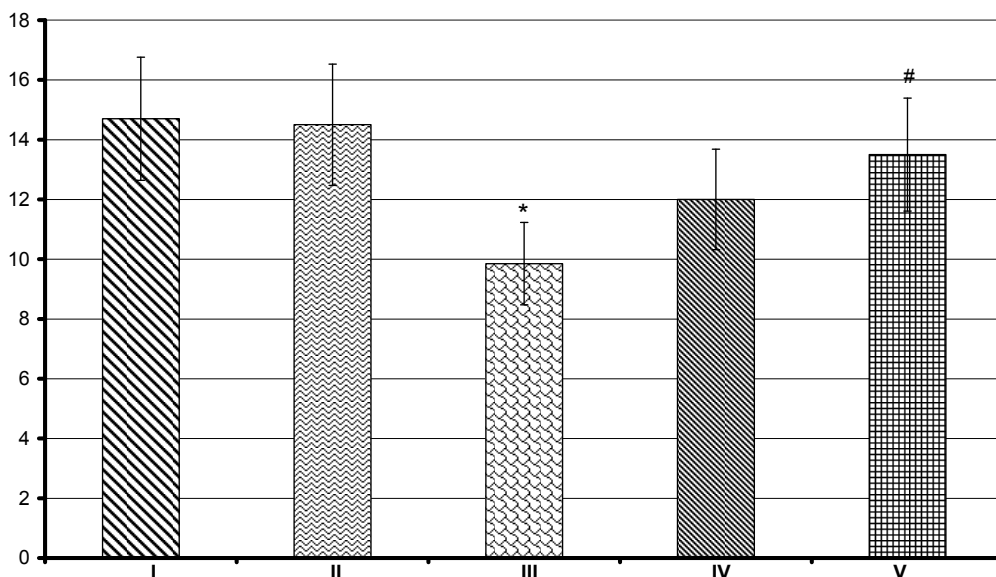


Рис. 2. Активность глутатионредуктазы в ткани сетчатой оболочки глаза крыс стрептозотозин-индуцированным диабетом в различных условиях лечения

По оси ординат: активность глутатионредуктазы (NADPH/мин/мг белка, нМ); по оси абсцисс – те же обозначения, что на рисунке 1.

\*- $P < 0,05$  в сравнении с показателем в группе интактных крыс с ЭС мозжечка; #- $P < 0,05$  – в сравнении с показателем в группе крыс с экспериментальным диабетом в отсутствие лечения.

активных форм кислорода по зависимо-  
мому от синтеза глутатиона пути. Так,  
у животных через полтора месяца с  
момента применения стрептозотозина  
регистровались снижение активности  
глутатионпероксидазы, которая  
уменьшалась в сравнении с таковой у  
интактных животных – на 42,0% и  
глутатионредуктазы – на 33,0%. По-  
добный результат соответствует дан-  
ным [3], которые также показали роль

недостаточности антиоксидантной  
ферментативной активности в патогене-  
зе диабетической ретинопатии.

В нашем исследовании установле-  
на протекторное влияние ЭС палео-  
церебеллярной коры в отношении диа-  
бет-вызванных нарушений активности  
ГПО и ГР, отмечаемых в тканях сетча-  
той оболочки. Причем, выраженность  
эффекта зависела от частоты ежеднев-  
ных ЭС и при трехкратном воздей-

ствии на палеocerebellum отмечался протективный эффект в отношении диабет-провоцированным ферментативных нарушений. По-видимому, в ткани сетчатой оболочки под влиянием ЭС мозжечка происходит усиление процесса восстановления тиоловых групп, в том числе и синтеза глутатиона, что было ранее отмечено в ткани головного мозга животных при ЭС старой коры мозжечка [1]. Возможно также, что положительные эффекты ЭС являются в значительной степени вторичными, обусловленными снижением продукции провоспалительных цитокинов, в частности, фактора некроза опухолей альфа вызываемого ЭС палеocerebellума [1].

Указанные эффекты ЭС мозжечка отмечались в условиях гипергликемии, а также сопровождалась более значительным увеличением массы тела животных в сравнении с таковым у крыс с диабетом в отсутствие ЭС. Следует подчеркнуть, что основным механизмом снижения массы тела у диабетических животных может быть повышенное образование мочевины, выраженная дегидратация и потеря электролитов на фоне высокого диуреза [3, 4]. В результате дегидратации тканей происходит липолиз и высвобождение высших жирных кис-

лот из депо липидов с последующим образованием кетоновых тел (ацетоацетат и бета-оксибутират), которые в свою очередь усиливают диурез, обеспечивая развитие патогенеза по типу порочного круга [4]. Рассматривая положительное влияние ЭС мозжечка на массу тела животного, следует отметить, что рецепторы лептина, обеспечивающего эффект насыщения, наиболее плотно расположены в тканях мозжечка [6, 8], что позволяет предполагать возможную роль структур мозжечка в регуляции пищевого поведения [6]. Причем, эффекты ЭС мозжечка не связаны с изменением уровня глюкозы крови и скорее могут объясняться ослаблением кетогенеза, так как установлена взаимосвязь выраженности противэпилептических эффектов ЭС мозжечка и применения кетогенной диеты [1].

### **Выводы**

1. Развитие ретинопатии при стрептозотонин-индуцированном сахарном диабете у крыс сопровождается снижением активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в сетчатой оболочке глаза.

2. Периодические электростимуляции (100 Гц) палеocerebellарной коры предотвращают диабет-

провоцированное снижение активности антиоксидантных ферментов в сетчатой оболочке.

### Литература

1. Кресюн Н.В. Патологические механизмы формирования диабетической ретинопатии и обоснование подходов к ее терапии / Н.В. Кресюн // Интегративная антропология. – 2013. – №1(21). – С. 43-48.
2. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах / В.М. Моин // Лаб. дело. – 1986. – Т.12. – С. 124-126.
3. Полифенолы виноградных вин предупреждают накопление нитротирозина и активациюраpг-1 в сетчатке глаза крыс со стрептозототин-индуцированным сахарным диабетом / В.Р. Дрель [и др.] // Мед. химия. – 2010. – Т. 1(42). – С. 2-33.
4. Al-Malki A.L. Oat attenuation of hyperglycemia-induced retinal oxidative stress and NF-κB activation in streptozotocin-induced diabetic rats/ A.L. Al-Malki // Hindawi Publishing Corporation. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2013. – <http://dx.doi.org/10.1155/2013/983923>.
5. Ding A.D. Protective effect of electrical stimulating cerebellar fastigial nucleus on ischemia and reperfusion-injury of rat retina / A.D. Ding, H. Zhang, J.M. Wang // Zhonghua Yan KeZaZhi. – 2004. – Vol.40, №6. – P. 400-403.
6. Effects of leptin deficiency and replacement on cerebellar response to food-related cues / S.M. Berman et al. // Cerebellum. – 2013. – Vol. 12, №1. – P. 59-67.
7. Goldberg D.M. Methods of Enzymatic Analysis // Weinheim: Verlag Chemie. – 1983. – Vol. 5(3). – P. 258-265.
8. Oldreive C.E. Neurotrophic effects of leptin on cerebellar Purkinje but not granule neurons in vitro / C.E. Oldreive, J. Harvey, G.H. Doherty // Neurosci. Lett. – 2008. – Vol. 438(1). – P. 17-21.
9. Protein measurement with the folinphenol reagent / O.N. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Tarr, R.J. Randall // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, №1. – P. 265-275.

---

Кресюн Наталья Валентиновна – канд. мед. наук, доцент кафедры офтальмологии.  
Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина.  
Тел.: +38048-7178916.  
Факс: +38048-7232215.  
E-mail: godlevsky@odmu.edu.ua.