

УДК: 663.2: 617.735: 616.831.711

ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ СТИМУЛЯЦИЯ СТАРОЙ КОРЫ МОЗЖЕЧКА ПОДАВЛЯЕТ ПРОЯВЛЕНИЯ РЕТИНОПАТИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Н.В. Кресюн, кандидат медицинских наук, доцент кафедры офтальмологии
Одесский национальный медицинский университет, Украина

Аннотация. Развитие ретинопатии при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете (в дозе 50,0 мг/кг) у крыс линии Вистар сопровождается снижением активности супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, увеличением содержания малонового диальдегида в ткани сетчатой оболочки глаза. Электрические стимуляции (100 Гц, три раза в сутки в течение месяца) палеоцереbellарной коры предотвращают снижение активности антиоксидантных ферментов и увеличение малонового диальдегида.

Ключевые слова: стрептозотоцин, диабетическая ретинопатия, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, малоновый диальдегид, мозжечок.

В патогенезе диабетической ретинопатии важными являются механизмы активации перекисного окисления липидов (ПОЛ), увеличение активности альдоредуктазы с накоплением метаболитических продуктов полиолового пути обмена глюкозы – фруктозы и сорбитола, интенсификация неферментативного гликозилирования, активация протеинкиназы типа С, что имеет своим следствием развитие капиллярнопатии и дегенеративные изменения в сетчатой оболочке глаза [1]. На фоне применения антиоксидантов выраженность указанных нарушений снижается, а также предотвращается развитие диабетической ретинопатии (ДР) [1, 6].

До настоящего времени мало исследованы центральные механизмы регуляции метаболизма в структурах сетчатой оболочки при формировании ДР, хотя показано, что под влиянием электрических стимуляций (ЭС) ядра шатра мозжечка регистрируются нейропротекторные эффекты на модели ишемического повреждения сетчатой оболочки у крыс [9]. В основе подобных эффектов может находиться антиоксидантное действие ЭС [4].

Поэтому целью настоящего исследования было изучение особенностей активности антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы (СОД) (КФ 1.15.1.1), каталазы (КТ) (КФ 1.11.1.6), глутатионпероксидазы (ГПО) (КФ 1.11.1.9), глутатионредуктазы (ГР) (КФ 1.8.1.7), а также малонового диальдегида (МДА) у крыс в условиях моделирования сахарного диабета применением стрептозотоцина (СТЗ), а также динамики этих показателей в условиях применения ЭС палеоцереbellарной коры мозжечка.

Материал и методы исследования. 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.).

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

Экспериментальный сахарный диабет вызывали в/бр введением натошак стрептозотоцина (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 [8]. Определение содержания глюкозы проводили в 9.00, в условиях доступа животных пищи в течение ночного времени. В течение всего наблюдения животным применяли введение инсулина (0-2 ед п/к два – пять раз в неделю) [8].

Животных разделяли на группы: 1) контроль-интактные ложнопериоперированные крысы (11 животных); 2) интактные крысы, которым осуществляли ЭС палеоцереbellарной коры (12 животных); 3) животные с сахарным диабетом без лечения (11 крыс); 4) крысы с диабетом, которым проводили ежедневные однократные ЭС палеоцереbellарной коры (10 животных); 5) крысы, которым проводили ежедневные трехкратные ЭС палеоцереbellарной коры (10 животных)

На 14-е сутки с момента применения СТЗ и на протяжении последующих четырех недель осуществляли ЭС палеоцереbellарной 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).

Животных удерживали в обычных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде. Взвешивание животных осуществляли каждые третьи сутки.

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

ром 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 13000об/мин и температуре + 4°C. Активность СОД определяли по [7] и выражали в % блокирования восстановления нитросинего тетразолия до окрашенного нитроформазана [1]. Активность КТ (H_2O_2 /мин/мг белка, нМ) – по [2], ГПО (GSH/мин/мг белка, нМ) – по [5] и ГТР (NADPH/мин/мг белка, нМ) – по [11]. Концентрацию белка определяли по методу [13].

МДА определяли спектрофотометрически по методу [3]. При этом исследуемый гомогенат инкубировали при высокой температуре в кислой среде с тиобарбитуратом и полученный раствор исследовали на спектрофотометре при длине волны 532 нм. В качестве стандарта применяли раствор тетраэтоксипропана. Содержание МДА выражали в нмолях/мг протеина.

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

Результаты исследования 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 ($P < 0,05$) (см. табл.).

Исследования активности ферментов антиоксидантной системы показало, что в условиях развития ЭД активность СОД уменьшалась на 52,7% в сравнении с группой контроля (интактные крысы) и составляла $79,5 \pm 6,7\%$ ($P < 0,05$) (Рис. 1). На фоне применения однократных ежедневных ЭС палеоцеребеллярной коры у крыс с диабетом активность СОД составила 68,6% от таковой в группе интактных крыс с ЭС мозжечка ($P < 0,05$). При этом исследуемый показатель был выше в сравнении с таковым у крыс с диабетом без ЭС на 13,0% ($P > 0,05$). В группе крыс с диабетом, которым проводили трехкратные ежедневные ЭС, активность СОД превышала соответствующий показатель у диабетических крыс без ЭС на 42,1% ($P < 0,05$) и при этом оставалась меньше показателя у интактных животных с ЭС мозжечка на 13,7% ($P > 0,05$).

Активность КТ у животных с экспериментальным диабетом составила $2,55 \pm 0,27$ нМ, что было меньше, чем у интактных крыс на 32,0% ($P < 0,05$) (Рис. 2). Под влиянием ежедневных однократных ЭС палеоцеребеллярной коры отмечалось увеличение исследуемого показателя в сравнении с крысами, у которых не применяли ЭС – на 6,7% ($P > 0,05$). Активность каталазы продолжала оставаться меньше таковой у интактных крыс на 27,5% ($P < 0,05$). В условиях более частых (три раза в сутки) ЭС активность КТ превышала соответствующий показатель в группе крыс с диабетом без ЭС мозжечка на 30,1% ($P < 0,05$) и была меньше, чем у интактных крыс с ЭС мозжечка на 13,1% ($P > 0,05$).

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. 3). 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% ($P < 0,05$) (Рис. 3). 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. 4) 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. 4).

ЭС старой коры мозжечка у интактных крыс вызывала незначительное (на 11,1%) увеличение содержания МДА в ткани сетчатки при сравнении с таковым у ложнооперированных крыс и составляла $2,01 \pm 0,30$ нмоль/мг протеина ($P > 0,05$) (Рис. 5). Содержание МДА в сетчатке у крыс с диабетом превышало соответствующий показатель, который регистрировался у крыс группы контроля в 3,1 раза и составлял $5,53 \pm 0,87$ нмоль/мг протеина ($P < 0,05$). На фоне ЭС палеоцеребеллярной коры, осуществляемых однократно ежедневно у крыс с экспериментальным диабетом, содержание МДА было сниженным в сравнении с таковым у крыс с диабетом без лечения на 10,5% ($P > 0,05$) и оставалось в 2,72 раза более высоким, чем у ложнооперированных животных ($P > 0,05$). На фоне трехкратных ежедневных ЭС старой коры содержание МДА уменьшалось до $2,71 \pm 0,42$ нмоль/мг протеина, что было меньше в сравнении с показателем у крыс с диабетом без ЭС вдвое ($P < 0,05$) и при этом оставалось в 1,5 раза более высоким в сравнении с показателем у ложнооперированных крыс ($P < 0,05$) (Рис. 5).

Полученные результаты, таким образом, показывают, что у крыс с экспериментальным диабетом, индуцированным применением стрептозотоцина, в ткани сетчатой оболочки глаза наблюдаются выраженные изменения со стороны активности ферментов, обеспечивающих антиоксидантное действие. Так, у животных через полтора месяца с момента применения стрептозотоцина регистрировалось снижение активности СОД, которая уменьшалась в сравнении с таковой у интактных животных на 40,7%, каталазы – на 32,0%, глутатионпероксидазы – на 42,0% и глутатионредуктазы – на 33,0%. Подобные изменения регистрировались на фоне увеличения в 2,75 раза содержания МДА – маркера перекисного повреждения мембраны клетки, который является

стабильным продуктом перекисной деградации полиненасыщенных жирных кислот. В этом процессе важную роль играет оксид азота, который может способствовать образованию пероксинитрита за счет реакции взаимодействия супероксида и МДА [14].

В нашем исследовании установлена протекторная роль влияния ЭС палеоцеребеллярной коры в отношении ДР, что также возможно объяснить повышением антиоксидантного потенциала непосредственно в тканях сетчатой оболочки животных с экспериментальным диабетом. Причем, если однократные ежедневные ЭС вызывали только тенденции к повышению активности СОД, КТ, то в отношении активности ГР эффект был более выраженным, что соответствует ранее установленному эффекту ЭС палеоцеребеллума в виде повышения образования в ткани мозга тиоловых групп и снижения содержания дисульфидных групп [4]. Также обращает на себя внимание и относительно более высокая эффективность ЭС в отношении восстановления активности ГПО, снижения содержания МДА. Возможно, что положительные эффекты ЭС являются в значительной степени вторичными, обусловленными снижением продукции провоспалительных цитокинов, в частности, фактора некроза опухоли альфа вызываемого ЭС палеоцеребеллума [4].

Указанные положительные эффекты ЭС мозжечка отмечались в условиях гипергликемии, а также сопровождалась более значительным увеличением массы тела животных в сравнении с таковой у крыс с диабетом в отсутствие ЭС. Рассматривая положительное влияние ЭС мозжечка на массу тела животного, следует отметить, что рецепторы лептина, обеспечивающего эффект насыщения, наиболее плотно расположены в тканях мозжечка [12], что позволяет предполагать возможную роль структур мозжечка в регуляции пищевого поведения [10].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антиоксидантный эффект природных полифенольных комплексов винограда в сетчатке глаза крыс с сахарным диабетом, индуцированным стрептозотоцином / А.Р. Гнатуш, В.Р. Дрель, А.Я. Яланецкий [и др.]. // Биологические студии / *Studia Biologica*. – 2011. – Т.5. – №2. – С. 61-72.
2. Королюк, М.А., Иванова, И.Г., Майорова, И.Г. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, И.Г. Иванова, И.Г. Майорова // *Лаб. дело*, 1988. – Т.1. – С. 16-18.
3. Липидные показатели кожи, мозжечка и продолговатого мозга при водно- иммерсионном стрессе у крыс. / Г.А. Грибанов, Н.В. Костюк, Ю.В. Абрамов [и др.]. // *Вопр. мед. химии*, 1999. – Т.2. – С. 32-36.
4. Моделирование и механизмы подавления экспериментального эпилептического синдрома / Л.С. Годлевский, Е.В. Кобелев, В.Ф. Мустаца, Г.А. Дроздова // – Одесса, 2010. – 350 с.
5. Моин, В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах / В.М. Моин // *Лаб.дело*, 1986. – Т.12. – С. 124-126.
6. Полифенолы виноградных вин предотвращают накопление нитротирозина и активацию parg-1 в сетчатке глаза крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом / В.Р. Дрель, А.Р. Гнатуш, А.Я. Яланецкий [и др.]. // *Мед. Химия*, 2010. – Т.1 (42). – С. 2-33.
7. Чевари, С., Андял, Т.Д., Штиренгер, Д. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в преклонном возрасте / С. Чевари, Т.Д. Андял, Д. Штиренгер // *Лаб. дело*, 1991. – Т.10. – С. 9-13.
8. 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 Volume*, 2013, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/983923>
9. Ding, A.D., Zhang, H., Wang, J.M. 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 Ke Za Zhi*. – 2004. – Vol. 40. – N 6. – P. 400-403.
10. Effects of leptin deficiency and replacement on cerebellar response to food-related cues / S.M. Berman, G. Paz-Filho, M.L. Wong et al. // *Cerebellum*. – 2013 Feb. – 12 (1). – 59-67. doi: 10.1007/s12311-012-0360-z.
11. Goldberg, D.M., Spooner, R.J., Bergmeyer, H.U. *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed. – Weinheim : Verlag Chemie, 1983. – Vol. 5 (3). – P. 258-265.
12. 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.
13. Protein measurement with the folin phenol reagent / O.N. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Tarr, R.J. Randall // *J. Biol. Chem.* – 1951. – V. 193. – №. 1. – P. 265-275.
14. The effect of chronic N (G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) administration on visual evoked potentials and oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats. / Y. Gül Özkaya, G. Hacıoglu, V. Kucukatay et al. // *J. Neurol. Sci*, 2011. – Vol. 28. – P.132-141.

Материал поступил в редакцию 20.01.14.

ELECTRIC STIMULATION OF CEREBELLAR ARCHICORTEX INHIBITS THE RETINOPATHY SIGNS AT EXPERIMENTAL DIABETES

N.V. Kresyun, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Ophthalmology Department
Odessa National Medical University, Ukraine

Abstract. The retinopathy development after sugar diabetes was induced in Wistar rats via *i.p.* streptozotocin (50,0 mg/kg) administration was characterized by suppression of the activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase, with the parallel elevation of the malone dialdehyde content. Electrical stimulations of paleocerebellum (100 Hz, three times daily, during one month) effectively prevented the diabetes-induced decreasing of antioxidative enzymes activity and increasing of malone daldehyde content.

Keywords: streptozotocin, diabetes retinopathy, superoxide dismutase, catalase, glutathioneperoxidase, glutathionereductase, malondialdehyde, cerebellum.

Таблица

Динамика уровня глюкозы крови и массы тела животных в условиях ЭС палеocerebellарной коры (M+m)

Группы крыс	Глюкоза крови, (ммоль/л)		Масса тела, (г)	
	Начальная	Окончательная	Начальная	Окончательная
Контроль (ложно оперированные крысы) (n=11)	5,65±0,37	5,82±0,43	218±14	297±18
Интактные+ ЭС мозжечка (n=12)	5,77±0,23	6,0±0,22	215±15	284±20
СТЗ- диабет (n=11)	19,32±0,68*	24,53±1,23*	187±7	207±24*
СТЗ диабет+ ЭС (однократные) (n=10)	18,5±0,35*	23,17±1,19*	188±7	243±18*
СТЗ- диабет+ ЭС (трехкратные) (n=10)	20,3±0,25*	25,4±1,72*	185±6	235±24*

Примечание: *-P < 0,05 в сравнении с показателем в группе контроля (ANOVA+ Newman-Keuls тест).

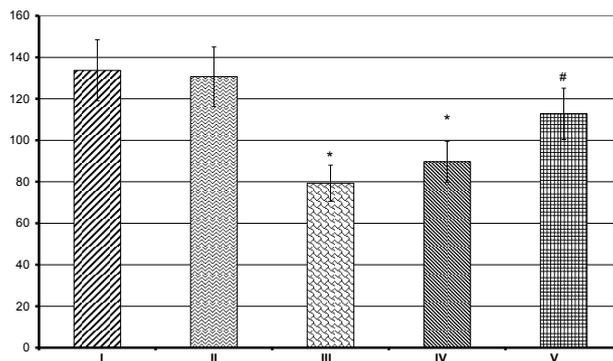


Рис. 1. Активность супероксиддисмутазы в ткани сетчатой оболочки глаза диабетических крыс в различных условиях ЭС коры мозжечка

По оси ординат: активность супероксиддисмутазы (% блокирования восстановления нитросинего тетразолия); по оси абсцисс – I – ложнооперированные крысы; II – интактные крысы с ЭС мозжечка; III – крысы с экспериментальным диабетом; IV – СТЗ-вызванный диабет+ ЭС палеocerebellарной коры (один раз в сутки, две недели); V – СТЗ-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.

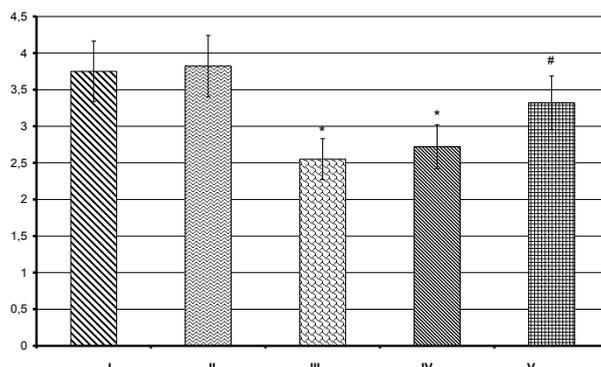


Рис. 2. Активность каталазы в ткани сетчатой оболочки глаза диабетических крыс в различных условиях ЭС коры мозжечка

По оси ординат: активность каталазы (H_2O_2 /мин/мг белка, нМ); по оси абсцисс – то же, что на Рис. 1.

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

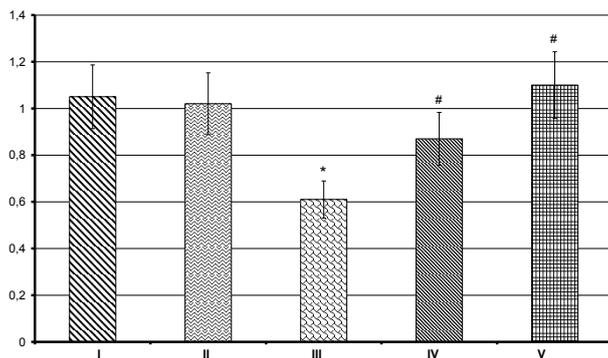


Рис. 3. Активность глутатинпероксидазы в ткани сетчатой оболочки глаза диабетических крыс в различных условиях ЭС коры мозжечка

По оси ординат: активность глутатинпероксидазы (GSH/мин/мг белка, нМ); по оси абсцисс то же, что на Рис. 1.

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

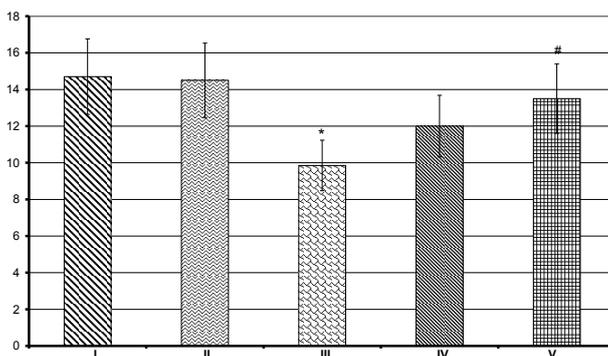


Рис. 4. Активность глутатионредуктазы в ткани сетчатой оболочки глаза диабетических крыс в различных условиях ЭС коры мозжечка

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

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

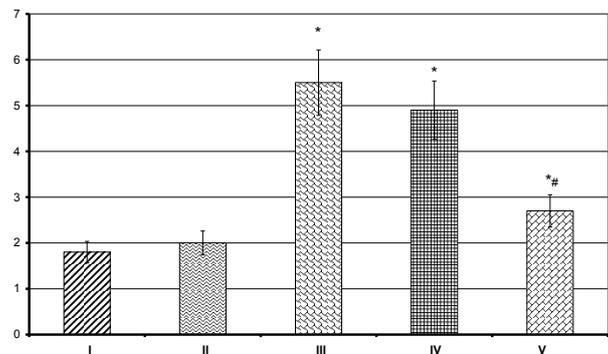


Рис. 5. Динамика содержания малонового диальдегида в ткани сетчатой оболочки глаза диабетических крыс в различных условиях ЭС коры мозжечка

Примечание: по оси ординат – содержание МДА (нмоль/мг протейна); по оси абсцисс – то же, что на Рис. 1.

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