

УДК 617.735–002–02:616.379–008.64–092.9–085

Защитное действие кверцетина и липоата на функциональные группы белков сетчатки при моделировании диабета

Н. В. Пасечникова¹, д-р мед. наук, профессор, член-корр. НАМН Украины, О. А. Мороз², канд. мед. наук

¹ ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им.

В. П. Филатова НАМН Украины»; Одесса (Украина)

² Закарпатская областная клиническая больница им. А. Новака; Ужгород (Украина)

E-mail: moroz.oleg@gmail.com

Вступ. Актуальність роботи полягає у вивченні дії впливу кверцетину і ліпоата при лікуванні експериментального діабету.

Мета дослідження. Вивчити вплив кверцетину та ліпоата на тиоловий статус білкових з'єднань в сітківці при моделюванні діабету.

Матеріал і методи. Дослідження проводилися на білих щурах. Піддослідні тварини були розділені на чотири групи: перша — контрольна група (14 щурів); друга — дослідна група (14 щурів) — з діабетом, без застосування препаратів; третя — дослідна група (12 щурів) — з діабетом і застосуванням ліпоєвої кислоти; четверта — дослідна група (15 щурів) — з діабетом і застосуванням кверцетину. У гомогенатах сітківки визначали вміст сульфгідрильних і дисульфідних груп білків.

Результати. Застосування препаратів ліпоєвої кислоти і кверцетину запобігає різкому зниженню рівня тиолових груп білків сітківки. У механізмі цього ефекту безсумнівно важливу роль відіграють їх антиоксидантні властивості.

Висновок. 1. Встановлено, що при розвитку стрептозотоцинового діабету відзначається прогресуюче зниження тиолових груп білків сітківки та підвищення дисульфідних містків, тобто окислення сульфгідрильних груп. 2. Застосування ліпоєвої кислоти і кверцетину запобігає значному зниженню рівня тиолових груп білків сітківки у тварин зі стрептозотоциновим діабетом, при цьому відзначали найбільш виражений ефект у тварин у двомісячний період розвитку експериментального діабету після застосування ліпоєвої кислоти, коли відмінності в рівні тиолів були статистично значущі.

Ключові слова: стрептозотоциновий діабет, сітківка, експеримент, тиолові групи білків

Ключевые слова: стрептозотоциновый диабет, сетчатка, эксперимент, тиоловые группы белков

Protective effect of quercetin and lipoate of functional groups on proteins in retina with experimental diabetes

NV Pasechnikova¹, OA Moroz²,

¹ SI «Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of NAMS of Ukraine»; Odessa (Ukraine)

² Zakarpatsky Regional Clinical Hospital named after A. Nowak; Uzhgorod (Ukraine)

Introduction. Relevance of the work is to study of influence of quercetin and lipoate on treatment with experimental diabetes.

Purpose. To study the effect of quercetin and lipoate on thiol groups of proteins in experimental diabetes.

Methods. Studies were conducted on white rats. Experimental animals were divided into four groups: first — control group (14 rats), the second — experimental group (14 rats), animals with diabetes, without the use of drugs, the third — the experimental group (12 rats), animals with diabetes, and the use of lipoic acid, the fourth — the experimental group (15 rats), animals with diabetes and the use of quercetin. In retinas homogenates produced determination of thiol groups of proteins.

Results. Application of preparations of lipoic acid and quercetin prevents the fall-off of level of thiol groups of proteins of retina. In the mechanism of this effect undoubtedly an important role is played by their antioxidant properties.

© Н. В. Пасечникова, О. А. Мороз, 2015

Conclusion. 1. It is set that at development of streptozotocin diabetes the making progress decline of thiol groups of proteins of retina and increase of disulfide bridges are marked, i.e. oxidization of sulfhydryl groups. 2. Application of lipoic acid and quercetin prevents the considerable decline of level of thiol groups of proteins of retina for animals with streptozotocin diabetes, here marked the most expressed effect for animals in a two-month period of development of experimental diabetes after application of lipoic acid, when differences in the level of thiols were statistically meaningful.

Key words: streptozotocin diabetes, retina, experiment, thiol groups of proteins

Введение. Проблема сахарного диабета в последнее время становится все более и более значимой [4, 22].

В Европе более 10 % от общего числа населения болеют сахарным диабетом. Не лучшая картина отмечается и среди населения Украины. Только по зарегистрированным случаям заболеваемости сахарным диабетом этот показатель на период 2005 года составлял 4 % от общего населения нашей страны [8].

Одним из наиболее частых и прогностически неблагоприятных проявлений сахарного диабета в настоящее время остается диабетическая ретинопатия, которая нередко приводит к значительному снижению зрения, слепоте и инвалидности [1].

Следует отметить, что распространенность диабетической ретинопатии прогрессивно увеличивается от нескольких процентов в группе больных с длительностью течения сахарного диабета менее 2 лет до 98 % — при длительности заболевания 15 лет и более. Это в значительной мере обусловлено тем, что выявление данной патологии на ранней стадии заболевания представляет определенные трудности. Особенно важным фактором является то обстоятельство, что не окончательно выяснен патогенез заболевания при различных формах сахарного диабета и стадиях диабетической ретинопатии, в связи с чем задерживается разработка достаточно эффективных патогенетически обусловленных способов лечения данной патологии [5, 12].

Многогранность патогенетических механизмов возникновения и развития диабетической ретинопатии и недостаточная эффективность имеющихся методов медикаментозной терапии этого заболевания обуславливают необходимость проведения углубленных исследований по выяснению пусковых механизмов, лежащих в основе значительного количества метаболических, иммунологических и функциональных нарушений органа зрения [1, 6, 10, 21].

В последние годы наши знания о патогенезе диабетических осложнений приобрели более четкий характер. В качестве пусковых метаболических нарушений, приводящих к поражению нервной, сосудистой и других тканей, рассматривается не только повышенный уровень глюкозы, но, главным образом, возрастание концентрации высокореактивных

метаболитов углеводно-фосфорного и липидного обменов, таких как: глиоксаль, метилглиоксаль, ацетоацетат, диоксиглюкоза, диацилглицерин и другие [13, 15, 20]. Повышение концентрации этих метаболитов не только повреждает обмен веществ, но и вызывает нарушения регуляции метаболизма и функции клеток [16].

Согласно многочисленным исследованиям, получены убедительные доказательства того, что в патогенезе диабетической ретинопатии важнейшим звеном является дисбаланс процессов свободно-радикального окисления (белков, липидов и др. компонентов) и потенциала антирадикальной системы («гашение» радикалов) экзогенного и эндогенного характера. В результате этого дисбаланса в организме резко повышается концентрация пероксидов и снижается уровень функциональных групп белков, в первую очередь, тиоловых групп [17, 18, 19].

Необходимо отметить важность выявленного ускоренного окисления SH групп в нервной ткани в патогенезе нейродегенеративного процесса, т.к. потеря белковыми структурами этих функциональных групп значительно нарушает их свойства и, как правило, приводит к снижению или полной утрате их ферментативной активности [12].

Общий анализ результатов по изучению состояния тиол-дисульфидной системы белков при моделировании сахарного диабета свидетельствует о выраженном оксидативном повреждении функциональных групп [2].

Установлено, что уровень сульфгидрильных групп в сетчатке при диабете резко снижен, при этом количество дисульфидных связей, как правило, повышено. В этой связи особое значение приобретает глутатион, главной функциональной особенностью которого является поддержание в восстановленном состоянии сульфгидрильных групп белков [2].

Следует отметить, что фитопрепараты (флавоноиды) оказывают выраженное защитное действие на тиоловую систему сетчатки при развитии сахарного диабета. Флавоноид кверцетин обладает заметно большим влиянием в отношении тиоловых групп белков и восстановленной формы глутатиона. Этот факт можно объяснить экспериментальными данными о стабилизирующем влиянии кверцетина на ферменты антиоксидантной системы (суперок-

сиддисмутазу, каталазу, глутатионпероксидазу и глутатионредуктазу), а главное — его действием на экспрессию ферментов, синтезирующих глутатион [11].

В связи с вышесказанным целью настоящей работы было изучить влияние кверцетина и липоеата на тиоловый статус белковых соединений в сетчатке при моделировании диабета.

Материал и методы

Исследования проводились на белых крысах линии Вистар массой 190–210 г.

Подопытные животные были разделены на четыре группы: первая - контрольная группа (14 крыс), вторая — опытная группа (14 крыс), животные с диабетом, без применения препаратов, третья — опытная группа (12 крыс), животные с диабетом и применением липоевой кислоты, четвертая — опытная группа (15 крыс), животные с диабетом и применением кверцетина.

Две группы животных с развивающимся диабетом получали перорально кверцетин и липоевую кислоту на протяжении всего периода эксперимента.

При проведении эксперимента были соблюдены рекомендации относительно исследований на животных, принятые международным сообществом в экспериментальной офтальмологии.

Диабет вызывали путем инъекции стрептозотоцина (55 мг на 1 кг веса тела, интраперитонеально) [10].

По истечении двух месяцев развития диабета часть животных (отдельные группы), находящихся в различных условиях эксперимента, а также нормальных крыс (контроль) декапитировали с предшествующей анестезией тиопенталом натрия (50 мг препарата на 1 кг массы). Глаза энуклеировали на льду при температуре 0–5°С.

По истечении шести месяцев развития диабета оставшуюся часть животных, все еще находящихся в различных условиях эксперимента, также забивали в соответствии с правилами работы с экспериментальными животными. Удаленная сетчатка животных сразу же подвергалась исследованию.

В гомогенатах сетчаток производили определение содержания сульфгидрильных и дисульфидных групп.

Принцип метода определения содержания сульфгидрильных групп состоит в определении количества тионитрофенильного аниона, освобожденного в результате взаимодействия 5,5'-дитиобис-нитробензойной кислоты (реактив Эллмана) со свободными тиоловыми группами белков. Количество образовавшегося тионитрофенильного аниона прямо пропорционально количеству свободных SH-групп белков, участвующих в реакции. Дисульфид, образовавшийся в результате реакции с реактивом Эллмана в присутствии дитиотрейтола, также диссоциирует с образованием тионитрофенильного аниона. Сопоставляя содержание свободного тионитрофенильного аниона до и после добавления дитиотрейтола (или доведения pH до 10,5), определяют количество дисульфидных групп в белке.

Ход определения. При определении содержания сульфгидрильных групп в кювету вносили 0,1 мл биологического материала, предварительно разведенного в зависимости от концентрации белка, 0,1 мл 0,2М раствора фосфатного буфера (pH 8,0) и 0,3 мл дистиллированной воды. Затем добавляли 0,02 мл 0,4 % раствор реактива Эллмана, приготовленного на 0,01 М растворе фосфатного буфера (pH

7,0). Через 2 мин измеряли оптическую плотность исследуемого раствора.

При определении содержания дисульфидных групп к 0,2 мл биологического материала, предварительно разведенного в зависимости от концентрации белка, добавляли 0,2 мл дистиллированной воды и 0,01 мл М трис-фосфатного буфера (pH 8,1) и 0,05 мл реактива Эллмана. После развития окраски измеряли оптическую плотность исследуемого раствора. Затем pH пробы тщательно доводили до 10,5 примерно 0,02 мл 0,1 н раствором гидроксида натрия и через 1–2 мин, в течение которых происходило отщепление тионитрофенильного аниона от дисульфидов, добавляли около 0,02 мл 0,1 н раствор соляной кислоты до pH 8,1 и измеряли оптическую плотность исследуемого раствора.

Оптическую плотность растворов измеряли при длине волны 412 нм на спектроколориметре «Specol-210» фирмы «Карл Цейс».

Среднее значение коэффициента вариации — 1,02 %.

Содержание сульфгидрильных и дисульфидных групп выражали в ммоль/г исследуемой ткани [3, 9, 14].

Полученные данные подвергали статистической обработки с помощью пакета SPSS 11.0 [7].

Результаты и их обсуждение

Данные о содержании белковых тиоловых и дисульфидных групп сетчатки белых крыс со стрептозотоциновым диабетом через 2 месяца при воздействии липоевой кислоты и кверцетина представлены в таблице 1.

Необходимо отметить, что содержание тиоловых групп у животных с диабетом без применения препаратов было понижено на 18,6 % по отношению к норме (1,45±0,09) ммоль/г (p<0,05).

Содержание тиоловых групп в сетчатке при экспериментальном развитии диабета и применении липоевой кислоты было повышено до (1,41±0,07)

Таблица 1. Содержание белковых тиоловых и дисульфидных групп сетчатки белых крыс со стрептозотоциновым диабетом через 2 месяца при воздействии липоевой кислоты и кверцетина (ммоль/г)

Биохимические показатели	Стат. показатели	Норма n=14	Диабет, 2 месяца		
			Без препарата n=14	Липоевая кислота n=12	Кверцетин n=15
Тиоловые группы	M	1,45	1,18	1,41	1,39
	m	0,09	0,08	0,07	0,06
	p ₁	–	<0,05	>0,05	>0,05
	%1	100,0	81,4	97,2	95,9
	p ₂	–	–	<0,05	>0,05
%1	–	100,0	119,5	117,8	
Дисульфидные группы	M	0,76	0,90	0,77	0,80
	m	0,04	0,05	0,04	0,05
	p ₁	–	<0,05	>0,05	>0,05
	%1	100,0	118,4	101,3	105,3
	p ₂	–	–	>0,05	>0,05
%1	–	100,0	85,6	88,9	

Примечание: p₁ — уровень значимости различий данных по отношению к норме; p₂ — уровень значимости различий данных по отношению к группе «Диабет».

ммоль/г, увеличение составило 19,5 % по отношению к группе диабетических животных без применения препарата ($1,18 \pm 0,08$) ммоль/г ($p < 0,05$).

В группе диабетических животных с применением кверцетина содержание тиоловых групп повысилось по сравнению с группой животных «без препарата» на 17,8 %, что составило ($1,39 \pm 0,06$) ммоль/г.

Через 2 месяца развития диабета при применении липоевой кислоты отмечается снижение содержания дисульфидных групп в сетчатке до ($0,77 \pm 0,04$) ммоль/г, что составило 85,6 % по сравнению с группой «без препарата» ($0,90 \pm 0,05$) ммоль/г.

В условиях воздействия кверцетина содержание дисульфидных групп понизилось по отношению к группе животных без препарата на 11,1 % ($0,80 \pm 0,05$) ммоль/г. Содержание дисульфидных групп у животных без препарата было повышено на 18,4 % по сравнению с нормой ($0,76 \pm 0,04$) ммоль/г.

Данные о содержании белковых тиоловых и дисульфидных групп сетчатки белых крыс со стрептозотоциновым диабетом через 6 месяцев при воздействии липоевой кислоты и кверцетина представлены в таблице 2.

Содержание тиоловых групп в сетчатке при экспериментальном развитии диабета и применении

липоевой кислоты было повышено до ($1,34 \pm 0,08$) ммоль/г, что составило 127,6 % по отношению к группе диабетических животных без применения препарата ($1,05 \pm 0,09$) ммоль/г ($p < 0,05$).

В группе диабетических животных с применением кверцетина содержание тиоловых групп повысилось на 22,9 %, составляя ($1,29 \pm 0,07$) ммоль/г, по сравнению с группой «без препарата» ($p < 0,05$). Содержание тиоловых групп при диабете без препарата было снижено на 27,6 % по сравнению с нормой ($1,45 \pm 0,09$) ммоль/г.

При развитии диабета и применении липоевой кислоты отмечается понижение содержания дисульфидных групп в сетчатке до ($0,78 \pm 0,04$) ммоль/г, что составило 82,1 % по сравнению с группой «без препарата» ($0,95 \pm 0,07$) ммоль/г ($p < 0,05$).

В условиях применения кверцетина содержание дисульфидных групп было понижено по отношению к контрольной группе животных до 86,3 %, что составило ($0,82 \pm 0,06$) ммоль/г. Содержание дисульфидных групп при диабете без применения препарата было повышено на 25,0 % по сравнению с нормой ($0,76 \pm 0,04$) ммоль/г.

Выявленные изменения в уровне тиоловых соединений в сетчатке при диабете можно рассматривать как важное патогенетическое звено повреждения сетчатки, в первую очередь вследствие нарушения антиоксидантного статуса органа зрения, что в свою очередь снижает общий антиоксидантный потенциал тканей сетчатки при развитии экспериментального диабета. Применение препаратов липоевой кислоты и кверцетина предотвращает резкое снижение уровня тиоловых групп белков сетчатки. В механизме этого эффекта несомненно важную роль играют их антиоксидантные свойства.

Выводы

1. Установлено, что при развитии стрептозотоцинового диабета отмечается прогрессирующее снижение тиоловых групп белков сетчатки и повышение дисульфидных мостиков, т.е. окисление сульфгидрильных групп.

2. Применение липоевой кислоты и кверцетина предотвращает значительное снижение уровня тиоловых групп белков сетчатки у животных со стрептозотоциновым диабетом, при этом наиболее выраженный эффект отмечали у животных в двухмесячный период развития экспериментального диабета после применения липоевой кислоты, когда различия в уровне тиолов были статистически значимы.

Таблица 2. Содержание белковых тиоловых и дисульфидных групп сетчатки белых крыс со стрептозотоциновым диабетом через 6 месяцев при воздействии липоевой кислоты и кверцетина (ммоль/г).

Биохимические показатели	Стат. показатели	Норма n=14	Диабет, 6 месяцев		
			Без препарата n=14	Липоевая кислота n=14	Кверцетин n=14
Тиоловые группы	M	1,45	1,05	1,34	1,29
	m	0,09	0,09	0,08	0,07
	p ₁	–	<0,01	>0,05	>0,05
	%1	100,0	72,4	92,4	89,0
	p ₂	–	–	<0,05	<0,05
Дисульфидные группы	M	0,76	0,95	0,78	0,82
	m	0,04	0,07	0,04	0,06
	p ₁	–	<0,05	>0,05	>0,05
	%1	100,0	125,0	102,6	107,9
	p ₂	–	–	<0,05	>0,05
	%1	–	100,0	82,1	86,3

Примечание: p₁ – уровень значимости различий данных по отношению к норме; p₂ – уровень значимости различий данных по отношению к группе «Диабет».

Литература

1. Александровский А. Я. Молекулярные механизмы развития диабетических осложнений. // Биохимия. — 1998. — Т. 63, № 11. — С. 1470–1479.
2. Балаболкин М. И. Роль гликирования белков, окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений при сахарном диабете // Рус. Мед. Журн. — 2006. — № 2. — С. 34–39.
3. Веревкина И. В., Точилкин А. И., Попова Н. А. Колориметрический метод определения SH-групп и S-S-связей в белках при помощи 5,5 дитиобис (2-нитробензойной) кислоты // В кн. Современные методы в биохимии. — М. «Медицина», 1977. — С. 223–231.
4. Веселовская З. В. Осложнения сахарного диабета со стороны органа зрения / З. В. Веселовская // Практична ангиологія. — 2006. — № 3. — С. 56–58.
5. Леус Н. Ф. Метаболические механизмы развития и перспективы медикаментозного лечения диабетической ретинопатии // Офтальмол. журн. — 2003. — № 5. — С.75–80.
6. Леус Н. Ф., Олейник Т. В., Коломийчук С. Г. Влияние препаратов витамина В₁ (кокарбоксилазы и бенфотиамин) на биофизические и метаболические процессы в сетчатке и плазме крови белых крыс со стрептозотоциновым диабетом. // Офтальм. журн. — 2007. — № 2. — С.70–75.
7. Наследов А. SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках. // Спб.: Питер, 2005. — 416 с.
8. Недзвецкая О. В. Современные направления в лечении диабетической ретинопатии / О. В. Недзвецкая // Междунар. мед. журнал. — 2000. — № 3. — С. 56–58.
9. Новые методы биохимического анализа. // Изд. Ленинградского универ. — 1991. — 395 с.
10. Полторак В. В., Блох К. О., Малашенко А. М. // «Экспериментальное моделирование сахарного диабета для изучения специфического эффекта новых анти-диабетических веществ. Методические рекомендации». — Харьков, 1991. — 19 с.
11. Цисельский Ю. Влияние биофлавоноидов на биохимические показатели сыворотки крови крыс с экспериментальным сахарным диабетом 2-го типа // Межд. эндокринол. журн. — 2007. — № 5. — С. 67–71.
12. Aiello L. P., Cahill M. T., Wong J. S. Systemic considerations in the management of diabetic retinopathy // Am. J. Ophthalmol. — 2001. — V. 32. — P. 760–776.
13. Bergamini C. M., Gambetti S., Dondi A. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. // Cur.Pharm. Design. — 2004. — Vol. 10 (14). — P. 1611–1626.
14. Bergmeyer H. U. Methoden der enzymatischen Analyse. — Herausgegeben von H. U. Bergmeyer. — Berlin. — 1986. — S. 2254–2265.
15. Bloomgarden Z. T. Diabetic retinopathy and diabetic neuropathy // J. Diabetes Care. — 2007. — Vol. 30 (3). — P. 760–765.
16. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications (a unifying mechanism). // J. Diabetes. — 2005. — Vol. 54. — P. 1615–1625.
17. Kowluru R. A., Chan P. S. Oxidative stress and diabetic retinopathy // Exp. Diabet. Res. — 2007. — 12 p.
18. Lorenzi M., Gerhardinger C. Early cellular and molecular changes induced by diabetes in the retina. // Diabetologia. — 2001. — Vol. 44. — P. 791–804.
19. Pan H.-Z., Zhang H., Chang D. et al. The change of oxidative stress products in diabetes mellitus and diabetic retinopathy // Br. J Ophthalmol. — 2008. — Vol. 92. — P.548–551.
20. Reyk D. M., Gillies M. C., Davies M. J. The retina: oxidative stress and diabetes // Redox Rep. — 2003. — V. 8 (4). — P. 187–192.
21. Speicher M. A., Danis R. P., Criswell M. Pharmacologic therapy for diabetic retinopathy / Expert Opin Emerg Drugs. — 2003. — V. 8 (1). — P. 239–250.
22. Wilkinson-Berka J., Miller A. Update on the treatment of diabetic retinopathy. // The Scientific World J. — 2008. — Vol. 8. — P. 98–120.

Поступила 20.05.2015.

References

1. Aleksandrovskii AYa. Molecular mechanisms of the development of diabetic complications. Biokhimiia. 1998;63(11): 1470–1479. In Russian.
2. Balabolkin MI. The role of protein glycation, oxidative stress in the pathogenesis of vascular complications in diabetes. Russ. Med. Zhurnal. 2006; 2:34–39. In Russian.
3. Verevkin IV, Tochilkin AL, Popova NA. Colorimetric method for determination of SH-groups and SS-links in proteins using 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic) acid. Modern methods in biochemistry. M.: Meditsina; 1997. 223–231.
4. Veselovskaia ZF. Diabetes complications of the eye. Praktichna angiologiya. 2006;3:56–8. In Russian.
5. Leus NF. Metabolic mechanisms of development and prospects of medical treatment of diabetic retinopathy. Oftalmol Zh. 2003;5:75–80. In Russian.
6. Leus NF, Oleinik TV, Kolomiichuk SG. Effect of vitamin B1 preparations (cocarboxylase and benfotiamine) on biophysical and metabolic processes in the retina and plasma albino rats with streptozotocin diabetes. Oftalmol Zh. 2007;2:70–75. In Russian.
7. Nasledov A. SPSS computer data analysis in psychology and social sciences. SPb.: Piter; 2005. 416 p.
8. Nedzvetskaia OV. Modern trends in the treatment of diabetic retinopathy. Mezhhdunar. Med. Zhurnal. 2000;3:56–58. In Russian.
9. New methods of biochemical analysis. Izd. Leningrad. Universiteta;1991. 395 p.
10. Poltorak VV, Blokh KO, Malashenko AM. «Experimental modeling of diabetes to study the specific effect of new anti-diabetic agents. Guidelines», Kharkov; 1991. 19 p.
11. Tsiselskii Yu. Effect of bioflavonoids on the biochemical indicators of blood serum of rats with experimental type 2 diabetes. Mezhd. Endokrinol. Zhurn. 2007;5:67–71/ In Russian.
12. Aiello LP, Cahill MT, Wong JS. Systemic considerations in the management of diabetic retinopathy. Am. J. Ophthalmol. 2001;32:760–776.

13. **Bergamini CM, Gambetti S, Dondi A.** Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Cur.Pharm. Design.* 2004;10 (14):1611–1626.
14. **Bergmeyer HU.** Methoden der enzymatischen Analyse. Berlin; 1986. 2254–2265.
15. **Bloomgarden ZT.** Diabetic retinopathy and diabetic neuropathy. *J. Diabetes Care.* 2007;30 (3):760–765.
16. **Brownlee M.** The pathobiology of diabetic complications (a unifying mechanism). *J. Diabetes.* 2005;54:1615–1625.
17. **Kowluru RA, Chan PS.** Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp. Diabet. Res.* 2007.12 p.
18. **Lorenzi M, Gerhardinger C.** Early cellular and molecular changes induced by diabetes in the retina. *Diabetologia.* 2001; 44: 791–804.
19. **Pan H-Z, Zhang H, Chang D et al.** The change of oxidative stress products in diabetes mellitus and diabetic retinopathy. *Br. J Ophthalmol.* 2008;92:548–551.
20. **Reyk D M, Gillies MC, Davies MJ.** The retina: oxidative stress and diabetes. *Redox Rep.* 2003;8 (4):187–192.
21. **Speicher MA, Danis RP, Criswell M.** Pharmacologic therapy for diabetic retinopathy. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2003; 8 (1): 239–250.
22. **Wilkinson-Berka J, Miller A.** Update on the treatment of diabetic retinopathy. *The Scientific World J.* 2008; 8: 98–120.

Received 20.05.2015.