

Экспериментальные исследования

УДК 617.735–002–02:616.379–008.64–092.9–085–07+577.11

Исследование влияния кверцетина и липоата на процессы перекисного окисления липидов в сетчатке при экспериментальном диабете

Н. В. Пасечникова¹, чл.кор. НАМН Украины, д. мед. н., проф., О. А. Мороз², канд. мед. наук

¹ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им.

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

²Закарпатская областная клиническая больница им.

А. Новака, офтальмологическое отделение, Ужгород (Украина)

E-mail: moroz.oleg@gmail.com

В експерименті на білих щурах проведені дослідження з вивчення вмісту малонового діальдегіду та дієнових кон'югатів в сітківці і плазмі крові при розвитку стрептозотоцинового діабету і застосуванні кверцетину і ліпоату. У цих умовах застосування досліджуваних препаратів значною мірою запобігало підвищенню проміжних продуктів ПОЛ в сітківці і плазмі крові у всі терміни розвитку діабету. Застосування ліпоєвої кислоти більшою мірою зменшувало накопичення кінцевих продуктів ПОЛ в сітківці і крові тварин зі стрептозотоциновим діабетом в усі терміни спостереження в порівнянні з кверцетином.

Ключевые слова: стрептозотоциновый диабет, сетчатка, малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты, эксперимент

Ключові слова: стрептозотоциновий діабет, сітківка, малоновий діальдегід, дієнові кон'югати, експеримент

Введение. Сосудистые заболевания глаз, в частности диабетическая ретинопатия, являются основной причиной развития слобовидения и слепоты в развитых странах [3, 21].

В настоящее время не существует достаточно эффективных методов профилактики и лечения диабетической ретинопатии, учитывая сложность и многоплановость патогенеза этого заболевания, вызывающего метаболические нарушения и развитие глубоких структурно-функциональных изменений в сетчатке [2, 12, 13, 16, 21].

Многочисленные исследования молекулярных механизмов развития диабетической ретинопатии создают экспериментально-клинические предпосылки для целенаправленного поиска патогенетически ориентированных методов профилактики и лечения этого заболевания [2, 4, 6, 16, 19].

Благодаря исследованиям последних лет появились доказательства роли свободно-радикальных процессов и, в частности, перекисного окисления липидов (ПОЛ) в диабетических поражениях сосудов сетчатки и других органов. В этом отношении весьма актуальными представляются исследования пигментного эпителия сетчатки, состояние которого при диабетической ретинопатии

изучено крайне недостаточно [5, 9, 17, 18, 20, 22, 23].

Окислительный стресс, сопровождающийся значительным увеличением уровня свободных радикалов, приводящих к повышению перекисного окисления липидов (диеновые конъюгаты, малоновый диальдегид и др.), блокирует синтез белка и нуклеиновых кислот, подавляет гликолиз и способствует разобщению процессов окислительного фосфорилирования, ингибирует активность некоторых ферментов (глюкозо-6-фосфатазы, аденилатциклазы и др.), что приводит к нарушению функций многих тканей. Супероксидные радикалы, в частности, активируют перекисное окисление липидов (ПОЛ) [17, 18, 19, 20, 22, 24].

В экспериментальных исследованиях было установлено, что в условиях моделирования стрептозотоцинового диабета уже в ранние сроки (28 суток) наблюдается существенное повышение продуктов ПОЛ в крови и сетчатой оболочке, при этом в последнем случае отмечается резкое возрастание концентрации малонового диальдегида [11].

Установлено, что применение витаминер V_6 и производных тиамин (Бенфотиамин, Мильгамма) заметно уменьшало накопление конечных продуктов ПОЛ (малонового диальдегида и диеновых конъюгатов) в сетчатке животных со стрептозотоциновым диабетом во все сроки наблюдения [7, 8].

Цель исследования. Изучить содержание продуктов перекисного окисления липидов у белых крыс со стрептозотоциновым диабетом при применении кверцетина и липоеата в сроки наблюдения до 6 месяцев.

Материал и методы

Исследование проведено в лаборатории биохимии ГУ «Институт ГБ и ТТ им. В. П. Филатова НАМНУ» на белых крысах линии Вистар массой 190–210 г.

Подопытные животные в каждой серии экспериментов (2 месячный и 6 месячный срок развития диабета) были разделены на четыре группы: контрольная группа (14 крыс), опытные группы: I группа — животные с диабетом без применения препаратов (14 крыс), II группа — животные с диабетом и применением липоевой кислоты (14 крыс), III группа — животные с диабетом и применением кверцетина (15 крыс).

Диабет вызывали путем инъекции стрептозотоцина (55 мг на 1 кг массы тела, интраперитонеально) [13].

Животные с развивающимся диабетом в каждой серии эксперимента получали перорально кверцетин и липоевую кислоту на протяжении всего периода наблюдения.

При проведении эксперимента были соблюдены рекомендации относительно исследований на животных, принятые международным сообществом при изучении органа зрения.

По истечении двух месяцев развития диабета часть опытных животных, а также контрольных крыс декапитировали после анестезии тиопенталом натрия (50 мг/кг).

По истечении шести месяцев развития диабета оставшаяся часть животных также выводилась из опыта в соответствии с правилами работы с экспериментальными животными.

После декапитации сразу энуклеировали глаза и выделяли сетчатку на льду при температуре 0–5°C. Гомогенат сетчатки готовили в соотношении 1:10 (вес ткани: объем среды для гомогенизации). После центрифугирования в супернатанте сетчаток и плазме крови производили спектрофотометрическое определение содержания малонового диальдегида и диеновых конъюгатов с использованием микрокувет.

Принцип метода определения содержания малонового диальдегида состоит в том, что при температуре 100°C в кислой среде малоновый диальдегид реагирует с 2-тиобарбитуровой кислотой, образуя окрашенный триметиновый комплекс с максимумом поглощения при длине волны 532 нм.

К исследуемой жидкости объемом 0,1 мл, с учетом разведения биологического материала, вносили 3 мл 1 % ортофосфорной кислоты (рН 2,0), 1 мл 0,6 % раствора тиобарбитуровой кислоты и 0,1 мл 0,28 % раствора сернокислого железа. Пробирки помещали в кипящую водяную баню на 60 мин. Затем пробирки охлаждали в холодной воде при 0–2°C и добавляли 4 мл бутанола, тщательно перемешивали и центрифугировали в течение 10 мин при 3 тыс. об/мин.

Измеряли оптическую плотность верхней фазы на спектроколориметре «Sresol — 210» при длине волны 535 нм против бутанола.

Расчет содержания продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, проводили с учетом коэффициента молярной экстинкции малонового диальдегида — $1,56 \cdot 10^5$ моль⁻¹·см⁻¹ и выражали в мкмоль/мл плазмы крови или мкмоль/г ткани.

Коэффициент вариации — 5,2 % [1].

Принцип метода определения диеновых конъюгатов основан на том, что при перекисном окислении на стадии образования свободных радикалов в молекулах полиненасыщенных высших жирных кислот возникает система сопряженных двойных связей, что сопровождается появлением нового максимума в спектре поглощения 233 нм.

К 0,5 мл исследуемой жидкости, с учетом разведения биологического материала, добавляли 4,5 мл экстрагирующей смеси гептана с изопропиловым спиртом в соотношении 1:1 (V:V). После экстракции к смеси добавляли 0,5 мл дистиллированной воды, отбирали из верхней (гептановой) фазы расслоившейся пробы 0,5 мл и смешивали с 2,5 мл этилового спирта. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-26 при 233 нм против этилового спирта.

Содержание диеновых конъюгатов рассчитывали с учетом молярного коэффициента экстинкции $2,2 \cdot 10^5$ М⁻¹·см⁻¹ и выражали в мкмоль/мл плазмы крови или мкмоль/г ткани [14, 15].

Полученные данные подвергали статистической обработке с помощью пакета SPSS 11.0 [9].

Результаты исследований и их обсуждение

Данные о содержании малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в плазме крови белых крыс со стрептозотоциновым диабетом через 2 и 6 месяцев при применении липоевой кислоты и кверцетина представлены в таблице 1.

Как видно из данных таблицы 1, через два месяца содержание малонового диальдегида в плазме крови животных с диабетом без применения препаратов было повышено на 78,4 %, что составило (31,29±2,25) мкмоль/мл по отношению к контролю (17,54±1,46) мкмоль/мл, а через шесть месяцев оно повысилось на 96,5 %, составляя (34,46±2,13) мкмоль/мл по отношению к контролю (р<0,001).

Во II группе животных, в условиях применения липоевой кислоты через два месяца после развития диабета содержание малонового диальдегида в плазме крови крыс было снижено до (24,98±1,58) мкмоль/мл, по сравнению с I группой на 20,2 % (р<0,05), а через шесть месяцев составило (25,68±1,75) мкмоль/мл, что на 25,5 % ниже, чем в I группе (р<0,01).

При применении кверцетина (III группа животных), спустя два месяца после развития стрептозотоцинового диабета, содержание малонового диальдегида в плазме крови крыс составило (26,07±1,86) мкмоль/мл, а через шесть месяцев — (26,95±1,86) мкмоль/мл, что было соответственно на 16,7 % и 78,2 % ниже, чем в I группе животных, не получавших препарат (р<0,05).

Таблица 1. Содержание ($M \pm m$, мкмоль/мл) малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в плазме крови белых крыс со стрептозотоциновым диабетом под воздействием липоевой кислоты и кверцетина

| Показатель | Контроль n=14 | Срок наблюдения 2 месяца | | | Срок наблюдения 6 месяцев | | |
|----------------------|------------------|--------------------------|-----------------|---------------------|---------------------------|-----------------|---------------------|
| | | Группы животных | | | Группы животных | | |
| | | I группа, n=14 | II группа, n=12 | III группа, n=15 | I группа, n=14 | II группа, n=12 | III группа, n=15 |
| Малоновый диальдегид | 17,54±1,46 | 31,29±2,25 | 24,98±1,58 | 26,07±1,86 | 34,46±2,13 | 25,68±1,75 | 26,95±1,86 |
| p ¹ | – | <0,001 | <0,01 | <0,01 | <0,001 | <0,01 | <0,001 |
| % | 100,0 | 178,4 | 142,4 | 148,6 | 196,5 | 146,4 | 153,6 |
| p ² | – | – | <0,05 | >0,05 | – | <0,01 | <0,05 |
| % | – | 100,0 | 79,8 | 83,3 | 100,0 | 74,5 | 78,2 |
| Диеновые конъюгаты | 3,47±0,28 | 5,70±0,36 | 4,59±0,30 | 4,73±0,32 | 6,19±0,42 | 4,85±0,39 | 5,02±0,31 |
| p ¹ | – | <0,001 | <0,05 | <0,01 | <0,001 | <0,01 | <0,001 |
| % | 100,0 | 164,3 | 132,3 | 136,3 | 178,4 | 139,8 | 144,7 |
| p ² | – | – | <0,05 | >0,05 | – | <0,05 | <0,05 |
| % | – | 100,0 | 80,5 | 83,0 | 100,0 | 78,4 | 81,0 |

Примечание: n — количество животных; p¹ — уровень значимости различий данных относительно контроля; p² — уровень значимости различий данных относительно I группы животных.

Уровень диеновых конъюгатов в плазме крови крыс после двухмесячного развития диабета в I группе животных составил (5,70±0,36) мкмоль/мл, что было на 64,3 % выше по сравнению с контролем — (3,47±0,28) мкмоль/мл, а через шесть месяцев он возрос на 78,4 %, составляя (6,19±0,42) мкмоль/мл (p<0,001).

При применении липоевой кислоты (II группа) через два и шесть месяцев развития диабета содержание диеновых конъюгатов в плазме крови крыс снижается до (4,59±0,30) и (4,85±0,39) мкмоль/мл, соответственно, т.е. на 80,5 % и 21,6 % по сравнению с I группой животных, не получавших препараты (p<0,05).

В условиях воздействия кверцетина через два и шесть месяцев развития диабета уровень диеновых

конъюгатов понизился, по сравнению с диабетическими животными, не получавшими препараты, на 17,0 % и 19,0 % (p<0,05), т.е. их содержание составило (4,73±0,32) мкмоль/мл и (5,02±0,31) мкмоль/мл, соответственно.

Данные о содержании малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в сетчатке белых крыс со стрептозотоциновым диабетом через 2 и 6 месяцев при применении липоевой кислоты и кверцетина представлены в таблице 2.

Из данных, представленных в таблице 2, видно, что содержание малонового диальдегида в сетчатке глаз I группы животных с диабетом через два месяца наблюдения составляло (7096,75±242,40) мкмоль/г, что было повышено до 781,1 % по отношению к контролю — (908,52±56,42) мкмоль/г, а через шесть месяцев уро-

Таблица 2. Содержание ($M \pm m$, мкмоль/г) малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в сетчатке глаз белых крыс со стрептозотоциновым диабетом под воздействием липоевой кислоты и кверцетина

| Показатель | Контроль n=14 | Срок наблюдения 2 месяца | | | Срок наблюдения 6 месяцев | | |
|----------------------|------------------|--------------------------|--------------------|---------------------|---------------------------|--------------------|---------------------|
| | | Группы животных | | | Группы животных | | |
| | | I группа, n=14 | II группа, n=12 | III группа, n=15 | I группа, n=14 | II группа, n=12 | III группа, n=15 |
| Малоновый диальдегид | 908,52±56,42 | 7096,75± 242,40 | 4981,92± 224,36 | 5536,43± 234,72 | 7381,72± 334,50 | 5068,63± 225,32 | 5125,86± 227,90 |
| p ¹ | – | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| % | 100,0 | 781,1 | 548,4 | 609,4 | 812,5 | 557,9 | 564,2 |
| p ² | – | – | <0,001 | <0,001 | – | <0,001 | <0,001 |
| % | – | 100,0 | 70,2 | 78,0 | 100,0 | 68,7 | 69,4 |
| Диеновые конъюгаты | 178,34±10,52 | 949,67±42,14 | 593,54±35,70 | 667,24±38,29 | 992,84±52,63 | 607,78±36,80 | 688,40±38,74 |
| p ¹ | – | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| % | 100,0 | 532,5 | 332,8 | 374,14 | 556,7 | 340,8 | 386,0 |
| p ² | – | – | <0,001 | <0,001 | – | <0,001 | <0,001 |
| % | – | 100,0 | 62,5 | 70,3 | 100,0 | 61,2 | 69,3 |

Примечание: n — количество животных; p¹ — уровень значимости различий данных относительно контроля; p² — уровень значимости различий данных относительно I группы животных.

вень малонового диальдегида возрос на 812,5 %, что составило ($7381,72 \pm 334,50$) мкмоль/г ($p < 0,001$).

Во II группе животных при применении липоевой кислоты через два месяца после развития диабета содержание малонового диальдегида в сетчатке глаз крыс было понижено до ($4981,92 \pm 224,36$) мкмоль/г, а после шести месяцев эксперимента снизилось до ($5068,63 \pm 225,32$) мкмоль/г, по сравнению с I группой животных, не получавших препараты, т.е. на 29,8 % и на 31,3 % соответственно ($p < 0,001$).

При применении кверцетина (III группа) через два месяца развития диабета содержание малонового диальдегида в сетчатке глаз крыс составило ($5536,43 \pm 234,72$) мкмоль/г по отношению к I группе животных без препарата, а через шесть месяцев — ($5125,86 \pm 227,90$) мкмоль/г, т.е. ниже на 22 % и на 30,6 %, соответственно ($p < 0,001$).

Содержание диеновых конъюгатов в сетчатке глаз крыс в I группе животных с диабетом, не получавших препараты, через два месяца было ($949,67 \pm 42,14$) мкмоль/г, а через шесть месяцев — ($992,84 \pm 52,63$) мкмоль/г, что на 532,5 % и 556,7 % соответственно выше, чем в контрольной группе животных — ($178,34 \pm 10,52$) мкмоль/г ($p < 0,001$).

При применении липоевой кислоты (II группа) уровень диеновых конъюгатов после двухмесячного развития стрептозотоцинового диабета в сетчатке глаз крыс был снижен до ($593,54 \pm 35,70$) мкмоль/г, а через шесть месяцев до ($607,78 \pm 36,80$) мкмоль/г что составляло 62,5 % и 61,2 % соответственно по отношению к I группе диабетических животных без применения препарата ($p < 0,001$).

В III группе животных с применением кверцетина через два месяца развития диабета содержание диеновых конъюгатов составило ($667,24 \pm 38,29$) мкмоль/г, а через шесть месяцев — ($688,40 \pm 38,74$) мкмоль/г, что, соответственно на 29,7 % и на 30,7 % ниже, чем в I группе животных ($p < 0,001$).

Выявленная нами столь высокая чувствительность липидов в сетчатке глаза крыс к свободно-радикальному окислению объясняется, прежде всего, тем, что в ней содержится значительное количество полиненасыщенных жирных кислот. Кроме того, сетчатка постоянно подвергается сочетанному воздействию света и кислорода, что также способствует повышенной генерации свободных радикалов [5].

Литература

1. Андреева Л. И., Кожемякин Л. А., Кишкун А. А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой. // Лаб. дело. — 1988, — 11, — С. 41–43.
2. Веселовська З. Ф., Кіндій Т. В. Діагностика доклінічної стадії та прогнозування прогресування діабетичної ретинопатії // Офтальмол. журн. — 2001. — № 1. — С. 13–16.
3. Дедов И. И., Шестакова М. В., Миленская Т. М. Сахарный диабет, ретинопатия, нефропатия. — М.: Медицина, 2001. — 175 с.
4. Ефимов А., Скоробонская Н., Зуева Н. Диабетическая невропатия // Ліки України. — 2005. — № 3. — С. 21–25.
5. Кравчук Е. А. Роль свободнорадикального окисления в патогенезе заболеваний глаз // Вестник офтальмологии. — 2004. — № 5. — С. 48–51.

Оценивая результаты данного исследования, следует отметить роль пигментного эпителия в защите нейроэпителия сетчатки от окислительного стресса. Однако при высоком уровне генерации свободных радикалов возможно повреждение и клеток пигментного эпителия вплоть до развития апоптоза [9].

Наблюдаемое в условиях стрептозотоцинового диабета в крови и особенно в тканях сетчатой оболочки повышение уровня продуктов перекисного окисления липидов дает основание полагать, что свободно-радикальное окисление ненасыщенных жирных кислот является важным звеном в механизме повреждения мембранных структур сетчатой оболочки при экспериментальном диабете.

Выводы

1. Развитие стрептозотоцинового диабета в течение шести месяцев приводило к резкой интенсификации процессов перекисного окисления липидов в сетчатке и крови экспериментальных животных. Об этом свидетельствует, прежде всего, более чем двух-трех кратное повышение уровня малонового диальдегида в крови и многократное увеличение этого конечного продукта перекисного окисления липидов в сетчатке (в среднем в 8 раз).

Повышение уровня малонового диальдегида в крови (в 2–3 раза) и многократное увеличение этого конечного продукта перекисного окисления липидов в сетчатке глаз крыс (в среднем в 8 раз) при развитии стрептозотоцинового диабета в течение шести месяцев свидетельствует о резкой интенсификации процессов перекисного окисления липидов при данном заболевании.

2. В условиях моделирования стрептозотоцинового диабета применение препаратов кверцетина и липоевой кислоты способствовало снижению уровня промежуточных продуктов перекисного окисления липидов в сетчатке глаз и плазме крови крыс на протяжении всего срока развития диабета.

3. Применение липоевой кислоты в большей степени уменьшило накопление конечных продуктов перекисного окисления липидов в сетчатке глаз и плазме крови животных со стрептозотоциновым диабетом во все сроки наблюдения по сравнению с кверцетином.

6. **Леус Н. Ф.** Метаболические механизмы развития и перспективы медикаментозного лечения диабетической ретинопатии // Офтальмол. журн. — 2003. — № 5. — С. 75–80.
7. **Леус Н. Ф., Олейник Т. В., Коломийчук С. Г.** Влияние препаратов витамина В₁ (кокарбоксылазы и бенфотиамин) на биофизические и метаболические процессы в сетчатке и плазме крови белых крыс со стрептозотоциновым диабетом // Офтальм. журн. — 2007. — № 2. — С. 70–75.
8. **Могилевский С. Ю., Чуйко А. Л.** Влияние различных форм витамина В₆ на уровень продуктов перекисного окисления липидов в сетчатке животных при развитии стрептозотоцинового диабета // Проблемы экологической и медицинской генетики и клинической иммунологии. — 2010. — № 6. — Т. 102. — С. 228–239.
9. **Мороз О. А.** Мембрано-протекторное воздействие кверцетина и липоата на лизосомы сетчатки при стрептозотоциновом диабете // Офтальмол. журн. — 2014. — № 3. — С. 76–80.
10. **Наследов А.** SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках. // Спб.: Питер, 2005. — 416 с.
11. **Павлюченко К. П., Олейник Т. В.** Исследование продуктов перекисного окисления липидов при развитии стрептозотоцинового диабета // Вестник неотложной и восстановительной медицины. — 2005. — Т. 6. — № 3. — С. 510–513.
12. **Пасечникова Н. В., Науменко В. А., Зборовская А. В.** Состояние гематоретинального барьера при диабетической ретинопатии по данным флюорометрии // Офтальмол. журн. — 2008. — № 5. — С. 4–7.
13. **Полторак В. В., Блох К. О., Малащенко А. М.** Экспериментальное моделирование сахарного диабета для изучения специфического эффекта новых антидиабетических веществ / Методические рекомендации. — Харьков. — 1991. — 19 с.
14. **Скорняков В. И., Кожемякин Л. А., Смирнов В. В.** и др. Продукты перекисного окисления липидов в спинномозговой жидкости у больных с черепно-мозговой травмой // Лаб. дело. — 1988. — № 8. — С. 14–16.
15. **Стальная И. Д.** Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот. — в кн. под ред. В. Н. Ореховича Современные методы в биохимии. — М.: Медицина, 1977. — С 63–64.
16. **Barber A. J.** A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. // Prog. In Neuro-Psychopharm. & Biol. Psych. — 2003. — Vol. 27. — P. 283–290.
17. **Bayness J. W.** Role of oxidative stress in development of complications in diabetes / Diabetes. — 1991. — V. 40. — P. 405–412.
18. **Feillet-Coudry C., Rock E., Coudry C.** Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental diabetes // ClinChimActa. — 1999. — V. 284. — P. 31–43.
19. **Forbes J. M., Yee L. T. L., Thallas V.** Advanced glycation end product interventions reduce diabetes-accelerated atherosclerosis // Diabetes. — 2004. — Vol. 53. — P. 1813–1823.
20. **Gutteridge J. M. C.** Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage // Clin. Chem. — 1995. — Vol. 41. — P. 1819–1828.
21. **Jain A., Sarraf D., Fong D.** Preventing diabetic retinopathy through control of systemic factors // Curr. Opin. Ophthalmol. — 2003. — Vol. 14. — № 6. — P. 389–394.
22. **Kesavulu M. M., Rao B. K., Giri R.** Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in Type 2 diabetic with coronary heart disease // Diabetes Res. Clin. Pract. — 2001. — Vol. 53. — P. 33–39.
23. **Reyk D. M., Gillies M. C., Davies M. J.** The retina: oxidative stress and diabetes / Redox Rep. — 2003. — V. 8 (4). — P. 187–192.
24. **Stitt A. W., Curtis T. M.** Advanced glycation and retinal pathology during diabetes. // Pharmac. Rep. — 2006. — Vol. 57. — P. 156–168.

Поступила 25.05.2016