

УДК 617.735-002:616.379-008.64:615.847-092

До механізмів формування ретинопатії при стрептозотоциновому діабеті на тлі електричних подразнень структур мозку

Н. В. Кресюн, д-р мед. наук, професор, Г. А. Сон, аспірант,

Л. С. Годлевський д-р мед. наук, професор

Институт проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины
Харьков (Украина)

E-mail: talochka.kr@yandex.ua

Актуальність. Електричне подразнення (ЕП) структур головного мозку, самої ретини супроводжується протизапальним впливом і може бути використано в комплексному лікуванні діабетичної ретинопатії.

Метою даного дослідження було визначення активності глутатіонредуктази (ГР), малонового діальдегіду (МДА) в сітківці ока, моніторинг маси тіла щурів з моделюванням за допомогою стрептозотину (СТЗ) діабетом, а також розкриття особливостей динаміки цих показників за умов ЕП палеоцеребелярної кори.

Матеріал і методи. У щурів лінії Вістар на 15-у добу з моменту застосування СТЗ (55,0 мг/кг, в/чер) здійснювали ЕП палеоцеребелярної кори (V-VII дольки) (80-120 мкА, 100 Гц) протягом 4 тижнів. Через 1,5 місяця з моменту введення СТЗ в гомогенаті сітківки визначали активність глутатіонредуктази та рівень МДА і результати виражали в NADPH/мин/мг білку, нМ та нмоль/мг протеїну, відповідно.

Результати. Маса тіла щурів із цукровим діабетом зростала на 10,7% у порівнянні до вихідного значення, в той час як в контролі зростання склало 36,2% ($p < 0,05$). На тлі ЕП (щодобових одно та трьохкратних) показник зростання склав 29,3 та 27,0% ($p < 0,05$). ЕП (тричі на добу) викликали збільшення активності в тканині сітківки щурів із діабетом ГР на 37,0% ($p < 0,05$), а також зменшення вмісту МДА на 44,5% ($p < 0,05$).

Висновок. ЕП палеоцеребелярної кори у щурів із СТЗ-індукованим діабетом попереджає втрату маси тіла, зниження активності ГР, а також збільшення вмісту МДА в тканині сітківки.

Ключевые слова:

стрептозотин, діабетична ретинопатія, перекисне окиснення, електричне подразнення, мозочок

Актуальність. Останнім часом встановлена ефективність щодо відновлення функції сітківки при експериментальній ретинопатії шляхом прямих електричних подразнень (ЕП) сітківки, що здійснювали як неінвазивно [6, 11], так і за допомогою імплантації мікрочипів, здатних генерувати ЕП під впливом сприйняття потоку світла [9]. Причому, в спектрі терапевтичного впливу подібних ЕП спостерігали ефекти зменшення проявів оксидантного стресу, а також зменшення продукції медіаторів запалення [8].

Подібна спрямованість безпосереднього впливу ЕП на сітківку потребує порівняння з механізмами терапевтичного впливу ЕП палеоцеребелярної кори, ефективність якого при експериментальній діабетичній ретинопатії встановлена в наших дослідженнях [1, 2]. Так, було показано, що подібні ЕП відстрочують в часі формування ретинопатії у щурів, у яких моделювали цукровий діабет введенням стрептозотину (СТЗ), що проявлялось у збереженні компонентів елетроретинограми, імунологічної реактивності та метаболічних показників, а також уповільненні дегенеративних процесів в сітківці [1, 2].

Таким чином, **метою** даного дослідження було визначення активності глутатіонредуктази (ГР), малонового діальдегіду (МДА) в сітківці ока, моніторинг

маси тіла щурів з моделюванням за допомогою стрептозотину (СТЗ) діабетом, а також розкриття особливостей динаміки цих показників за умов ЕП палеоцеребелярної кори.

Матеріал та методи

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

Під нембуталовим наркозом (40,0 мг/кг, в/чер) щурам імплантували біполярні ніхромові електроди (міжелектродна відстань 0,25-0,3 мм) в дольки V-VII палеоцеребелярної кори, які кріпили до поверхні черепа за допомогою пластмаси типу «Норакрил», що швидко твердіє. Тварин спостерігали, починаючи з 7-10-ї доби з моменту виконання оперативного втручання.

Експериментальний цукровий діабет відтворювали шляхом в/чер застосування СТЗ натще в дозі 55,0 мг/кг («Sigma Aldrich.ru» Москва), який розчиняли в буферному натрієво-цитратному розчині (рН 4,5). Через один

та два тижні з моменту застосування СТЗ у щурів в венозній крові, яку отримували із хвостової вени, визначали вміст глюкози і в подальших дослідженнях спостерігали тільки тих щурів, у яких вміст глюкози складав більше 300 мг/л [5]. Дослідження вмісту глюкози здійснювали о 9.00, за умов вільного доступу експериментальних тварин до їжі та води на протязі нічного періоду. Впродовж всього періоду спостереження щурам застосовували інсулін (0-2 од п/к два – п'ять разів на тиждень) [5].

Експериментальних тварин розподілили на наступні групи:

1) контроль – інтактні хібно («ложно», або «псевдо») оперовані щури (11 щурів); 2) інтактні щури, яким здійснювали ЕП палеоцеребелярної кори (12 щурів); 3) щури із діабетом хібно стимульовані (11 щурів); 4) щури з діабетом, яким щодобово виконували однократні ЕП палеоцеребелярної кори (10 щурів); 5) щури з діабетом, яким проводили щодобові трьохкратні ЕП палеоцеребелярної кори (10 тварин).

На 14-15-у добу з моменту застосування СТЗ і на протязі наступних чотирьох тижнів здійснювали ЕП палеоцеребелярної кори за допомогою імплантованих електродів. ЕП проводили електростимулятором універсальним (ЕСУ-2, Україна), який генерував прямокутні імпульси силою струму 80-120 мкА, частотою імпульсів 100 Гц, тривалістю ЕП 2,5 с. Застосовували однократні (9.00) та трьохкратні щодобові режими ЕП (9.00; 14.00; 19.00).

По закінченні спостереження здійснювали евтаназію і у декапітованих тварин видалені тканини заморожували та зберігали у рідкому азоті. Виділені тканини сітківки промивали фосфатним буферним розчином з метою видалення компонентів крові і гомогенізували в 0,1 М фосфатного буферного розчину (рН 7,0) виходячи із розрахунку 1:10 (вага/об'єм). Гомогенізовані зразки центрифугували на протязі 15 хв при 13000 об/хв і температурі + 4°C.

МДА визначали спектрофотометрично за методом [4]. Згідно методу здійснювали інкубацію досліджуваного гомогенату при 40° С в кислому середовищі з тіобарбітуратом і отриманий рожевий за кольором розчин досліджували на спектрофотометрі при довжині хвилі світла 532 нм. В якості стандарту використовували розчин тетраетоксипропану. Вміст МДА виражали в нмолях/мг протеїну. Вміст протеїну досліджували за методом Lowry [4]. Активність ГР (NADPH/хв/мг білку, нМ) визначали за методом Goldberg D.M. [7].

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

Результати дослідження та їх обговорення

На момент закінчення експериментального спостереження маса тіла щурів групи контролю зростала у порівнянні до вихідної маси тварин на 36,2% і складала 297±18,3 г. Зростання маси тіла щурів із ЕП палеоцеребелярної кори за аналогічний період часу складало відповідно 29,3 та 27,0% при однократних та

трьохкратних щодобових ЕП, що не відрізнялося від показника в групі контролю ($p>0,05$) і перевищувало його вихідне значення до застосування СТЗ ($p<0,05$). В той же час в групі щурів із діабетом без застосування ЕП аналогічний показник склав 10,7% ($p<0,05$). У всіх групах спостереження вміст глюкози в крові перевищував відповідний показник у інтактних щурів в 3,3-4,4 рази ($p<0,05$).

Активність ГР в тканині сітківки ока щурів з діабетом за відсутності ЕП мозочка складала $9,85\pm0,11$ нМ (рис. 1) і була на 33,0% меншою порівняно до відповідного показника у інтактних щурів ($p<0,05$). Досліджуваний показник в групі щурів з СТЗ-викликаним діабетом, яким застосовували однократні щодобові ЕП мозочка, був на 21,8% більшим у порівнянні з таким у щурів з діабетом без ЕП ($p>0,05$) і при цьому залишався меншим, ніж у інтактних щурів на 18,4% ($p>0,05$). На тлі застосування більш частих ЕП (тричі на добу) активність ГР зростала на 37,0% ($p<0,05$) у порівнянні до показника у щурів з діабетом і була на 8,2% меншою, ніж у інтактних щурів ($p>0,05$). На тлі трьохкратних щодобових ЕП інтактних щурів активність ГР була меншою на 3,7% у порівнянні до групи контролю – інтактних щурів без ЕП ($p>0,05$) (рис. 1).

Вміст МДА в тканині сітківки у інтактних щурів склав $1,90\pm0,25$ нмоль/мг протеїну ($p>0,05$) (рис. 2). Аналогічний показник, який визначався в тканині сітківки у щурів із цукровим діабетом, був в 2,9 рази більш високим і складав $5,51\pm0,72$ нмоль/мг протеїну ($p<0,05$). На тлі застосування ЕП частотою один раз на добу у щурів з діабетом вміст МДА був зниженим порівняно до такого у щурів з діабетом на 7,7% ($p>0,05$) і залишався достовірно більш високим (в 2,63 рази) порівняно до показника у інтактних щурів групи контролю ($p<0,05$). На тлі більш частих ЕП (тричі на

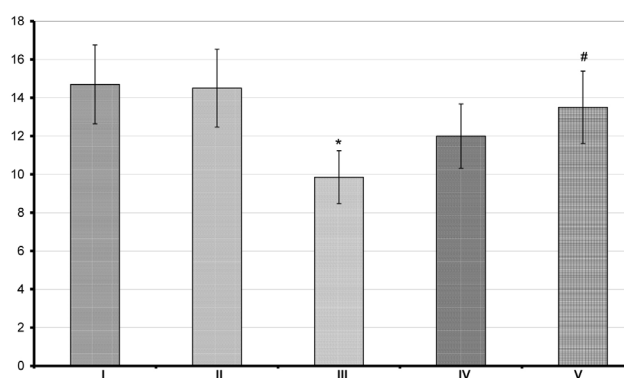


Рис. 1. Активність глутатіонредуктази в тканині сітківки ока щурів із СТЗ-модельованим діабетом за різних умов ЕП. По вісі ординат: активність глутатіонредуктази (NADPH/хв/мг протеїну, нМ); I – інтактні щури; II – інтактні щури з ЕП мозочка; III – щури з експериментальним діабетом; IV – щури з діабетом та ЕП частотою один раз на добу; V – щури з діабетом та ЕП частотою тричі на добу. * – $p<0,05$ у порівнянні до показника в групі інтактних щурів з ЕП мозочка; # – $p<0,05$ – у порівнянні до показника в групі щурів з діабетом за відсутності ЕП.

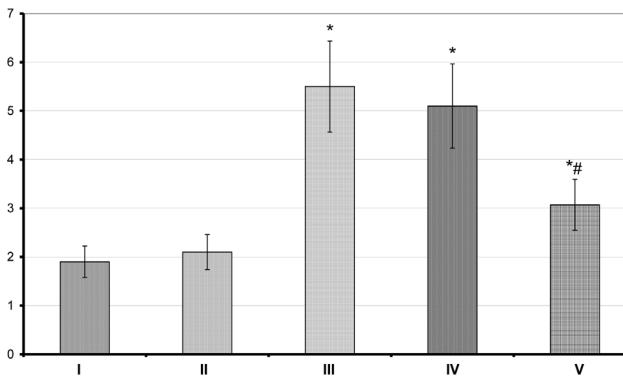


Рис. 1. Динаміка вмісту малонового діальдегіду в тканині сітківки ока щурів із СТЗ-модельованим діабетом за різних умов ЕП.

Позначки: по вісі ординат – досліджуваний показник (нмоль/мг протеїну); по вісі абсцис – те ж, що на Рис. 1. * – $p < 0,05$ у порівнянні до показника в групі інтактних щурів з ЕП мозочка; # – $p < 0,05$ – у порівнянні до показника в групі щурів з діабетом за відсутності ЕП.

добу) вміст МДА зменшувався до $3,05 \pm 0,31$ нмоль/мг протеїну, що було на 44,5% менше порівняно з показником у щурів із діабетом без лікування ($p < 0,05$) і при цьому показник залишався більш високим (в 1,60 разу) порівняно до такого у інтактних щурів ($p < 0,05$). Слід зазначити, що вміст МДА в тканині сітківки інтактних щурів за умов ЕП частотою тричі на добу був вищим від такого у інтактних щурів на 10,5% ($p > 0,05$) (Рис. 2).

Таким чином, отримані результати засвідчили, що розвиток експериментального діабету, викликаного застосуванням СТЗ, супроводжується підвищенням перекисних процесів в тканині сітківки, які визначались у вигляді зниження активності ГР та підвищенні вмісту МДА. Подібні зміни є характерними для виникнення експериментальної діабетичної ретинопатії [1, 5]. Крім того, у щурів на тлі діабету спостерігалась значна втрата маси тіла. Вказані порушення попереджались на тлі періодичних ЕП палеоцеребелярної кори і вплив аналогічної ЕП у інтактних щурів не супроводжувався змінами досліджуваних показників.

Слід підкреслити, що зазначений характер ефектів ЕП кори мозочка значною мірою відповідає характеру впливу безпосередньої ЕП сітківки ока. Так, під впливом ЕП сітківки встановлене гальмування продукції інтерлейкіну-1-бета та фактора некрозу пухлин-альфа клітинами мікроглії, ізольованої у щурів лінії Sprague-Dawley, а також збільшення продукції мозкового фактора росту (BDNF) та ціліарного фактора росту в Мюлерових клітинах [8]. За подібних умов також спостерігалось зменшення активності проапоптогенного гену Вах [11]. Крім того, механізмом нейропротекції є збільшення продукції інсуліноподібного фактору росту (IGF-1) клітинами Мюллера [9], в культурі ретинальних Мюллерових клітин визначено зростання експресії фактора росту фібробластів-2 під впливом ЕП [8, 9]. Подібні зміни, а також диференційна експресія

більше ніж 490 генів, яка спостерігається за умов ЕП сітківки [6], виникає протягом першої години і зберігається на протязі 35 г після ЕП, супроводжується зростанням продукції 25 білків, в тому числі клітинних сигнальних протеїнів, протеїни, які асоційовані з синаптичною трансмісією, метаболічних протеїнів, імунологічні фактори, а також структурні протеїни розцінюється як потужний протизапальний ефект.

Зазначені глибокі зміни метаболізму нервової тканини також мають своїм наслідком збереження маси тіла щурів з діабетом, що може бути пов'язаним з впливом ЕП мозочка на продукцію лептину [3]. Крім того, збереження маси тіла є свідченням його безпечності, важливим індикатором відсутності сторонніх впливів застосованої процедури ЕП [5].

Можливим механізмом ефектів ЕП на стан ретини, який за своїм характером відповідає ефекту прямої ЕП сітківки, є антидромні церебело-текто-ретинальні впливи, які здійснюються через відповідні ретино-колікуло-церебелярні зв'язки [10] і супроводжується нормалізацією продукції цитокінів, зменшенням проявів нітрозативного стресу та нейропротекцією [1, 2]. Зважаючи на більшу безпечність ЕП структур мозочка у порівнянні з прямим – трансорбітальним, транспальпебральним чи транскорнеальним впливом ЕП, можливо вважати доцільним подальші дослідження, пов'язані з оптимізацією використання ЕП мозочка в офтальмологічній практиці.

Висновки

1. Отримані результати засвідчили збереження маси тіла щурів із діабетом за умов застосування ЕП мозочка.
2. ЕП палеоцеребелярної кори попереджує викликане СТЗ-індукованим діабетом зниження активності ГР, а також підвищення вмісту МДА в тканині сітківки.
3. ЕП палеоцеребелярної кори не викликає змін досліджуваних показників в тканині сітківки інтактних щурів.
4. Отримані результати свідчать щодо можливості безпечного застосування ЕП палеоцеребелярної кори, яке може бути застосовано в офтальмологічній практиці в якості компонента комплексної корекції проявів ретинопатії.

Література

1. Кресюн Н. В. Патофизиологические механизмы формирования диабетической ретинопатии и обоснование подходов к ее терапии / Н. В. Кресюн // Интегративная антропология. – 2013. – №1(21). – С.43-48.
2. Кресюн Н. В. Нейродегенеративные изменения сетчатой оболочки глаз крыс со стрептозотоциновым диабетом в различных условиях экспериментального лечения / Н. В. Кресюн // Запорожский мед. журн. – 2014. – №4. – С.21-25.
3. Муратова Т. М. Динаміка вмісту лептину і продукування інтерлейкіну-1 мононуклеарними клітинами у хворих на епілепсію за різних умов лікування/ Т. М. Муратова //

- Український вісник психоневрології. – 2016. – Т.24, вип. 1(86). – С.41-44.
4. **Стальная И. Д.** Определение диеновых конъюгатов: Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 63–64.
 5. **Al-Malki A.L.** Oat attenuation of hyperglycemia-induced retinal oxidative stress and NF- κ B activation in streptozotocin-induced diabetic rats/ A.L. Al-Malki//Hindawi Publishing Corporation: Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume. - 2013, Article ID 983923, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/983923>.
 6. Gene expression profiling of the retina after transcorneal electrical stimulation in wild-type Brown Norway rats / G. Willmann, K. Schaferhoff, M. D. Fischer et al. // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2011. – Vol.52. – P.7529-7537.
 7. **Goldberg D. M.** Methods of Enzymatic Analysis, 3rd ed. Weinheim: Verlag Chemie. – 1983. – Vol.5 (3). – P.258-265.
 8. Electrical stimulation ameliorates light-induced photoreceptor degeneration in vitro via suppressing the proinflammatory effect of microglia and enhancing the neurotrophic potential of Muller cells / W. T. Zhou, Y. Q. Ni, Z. B. Jin et al. // Exp. Neurol. – 2012. – Vol.238. – P.192-208.
 9. Electrical stimulation as a means for improving vision/ A. Sehic, S. Guo, K.-S. Cho et al. // Am. J. Pathol. – 2016. – Vol.186. – P. 2783-2797.
 10. **Khamare B. S., Combs C. M.** Duality in retinocerebellar projections in the rabbit / B. S. Khamare, C. M. Combs // Exp Neurol. – 1975. – Vol.48. – №3, part 1. – P.610-623.
 11. Neuroprotective effect of transcorneal electrical stimulation on light-induced photoreceptor degeneration / Y. Q. Ni, D. K. Gan, H. D. Xu et al. // Exp Neurol. – 2009. – Vol.219. – P.439-452.

Поступила 25.06.2017

К механизму формирования ретинопатии при стрептозотоциновом диабете на фоне электрических стимуляций структур мозга

Кресюн Н. В., Сон А. А., Годлевский Л. С.

Одесский национальный медицинский университет; Одесса (Украина)

Введение. Электрическая стимуляция (ЭС) структур головного мозга, а также сетчатки сопровождается развитием противовоспалительных эффектов, что позволяет применять её в комплексном лечении диабетической ретинопатии.

Целью исследования было определение активности глутатионредуктазы (ГР), малонового диальдегида (МДА) в сетчатке глаза, мониторинг массы тела крыс с моделированным стрептозотоцином (СТЗ) диабетом, а также раскрытие особенностей динамики этих показателей в условиях ЭС палеоцереbellарной коры.

Материал и методы. У крыс линии Вистар на 15-е сутки с момента применения СТЗ (55,0 мг/кг, в/бр) проводили ЭС палеоцереbellарной коры (V-VII доли) (80-120 мкА, 100 Гц) на протяжении 4 недель. Через 1,5 месяца с момента введения СТЗ в гомогенате сетчатки определяли активность ГР, уровень МДА и

результаты выражали в NADPH/мин/мг, нМ и нмолях/мг белка соответственно.

Результаты. Масса тела крыс с сахарным диабетом за период наблюдения возрастала на 10,7% в сравнении с исходным значением, в то время как в контроле увеличение массы тела составило 36,2% ($p < 0,05$). На фоне ЭС (ежедневных одно- и трехкратных) показатель роста массы тела составил 29,3 и 27,0% ($p < 0,05$). Под влиянием ЭС (трижды в сутки) в ткани сетчатки наблюдалось увеличение активности ГР у крыс с диабетом на 37,0% ($p < 0,05$), а также уменьшение содержания МДА на 44,5% ($p < 0,05$) в сравнении с показателями у крыс с диабетом.

Выводы ЭС палеоцереbellарной коры у крыс с СТЗ-индуцированным диабетом предупреждает потерю массы тела, снижение активности ГР и увеличение содержания МДА в ткани сетчатой оболочки.

Ключові слова: стрептозотозин, диабетическая ретинопатия, перекисное окисление, электрическая стимуляция, мозжечок