

**СТАБИЛЬНОСТЬ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ МЕМБРАН СЕТЧАТКИ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ СРЕПТОЗОТОЦИНОВОМ ДИАБЕТЕ В УСЛОВИЯХ МЕДИКАМЕНТОЗНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ (АЦЕТИЛЦИСТЕИНОМ, ФЛАВОНОИДОМ И ТАУРИНОМ)**

**Т. И. Гладуш**, канд. мед. наук, **Е. И. Байдан**, ст. лаборант

ГУ Институт глазных болезней и тканевой терапии им. акад. В. П. Филатова НАМН Украины,  
г. Одесса

*Вивчався вплив ацетилцистеїна і таурину на стан лізосомальних мембран в сітківці білих щурів з експериментальним стрептозотоциновим діабетом. Розвиток експериментального діабету супроводжувався змінами у лабільності лізосомальних мембран сітківки, які приводили до збільшення в цитозолі вільної форми маркерного фермента кислої фосфатази та зменшення зв'язаної форми його у лізосомах. Застосування ацетилцистеїна і біофлавоноїда сприяло підвищенню стабільності лізосомальних мембран — рівень вільної форми кислої фосфатази в цитозолі клітинних структур сітківки знижувався.*

**Ключевые слова:** стрептозотоциновый диабет, лизосомальные мембраны сетчатки, лечение, эксперимент

**Ключові слова:** стрептозотоциновий діабет, лізосомальні мембрани сітківки, лікування, експеримент

**ВВЕДЕНИЕ.** Одним из внутриглазных осложнений сахарного диабета является диабетическая ретинопатия (ДР), которая представляет собой основную причину слепоты не только в нашей стране, но и в зарубежных державах, где прогрессирование этого заболевания возрастает с каждым годом, определяя ее серьезную социальную значимость. ДР — тяжелое заболевание сетчатки, в равной степени характерное для инсулинозависимого и инсулиннезависимого сахарного диабета [4, 15, 25, 28].

Общепризнанным методом терапии ДР является лазерная коагуляция сетчатки. Однако, несмотря на усовершенствование метода лазерного лечения, в 50 % случаев после его применения болезнь продолжает прогрессировать [Нестеров А. П., 2000; Cunha-Vaz J. G., 2001; Yin Wong, 2002]. Поэтому в офтальмологических исследованиях приоритетными являются новые формы терапии ДР с возможностью их применения уже на ранних стадиях заболевания [1, 3, 8, 21, 27, 29, 30]. Таким образом, профилактика и лечение ДР обуславливает необходимость проведения углубленных исследований патогенеза этого заболевания.

В последние годы появились доказательства роли свободно-радикальных процессов и, в частности, перекисного окисления липидов в диабетических поражениях сосудов сетчатки и других органов [10, 12, 20, 30, 31]. В этом отношении весьма актуальным представляется исследование пигментного эпителия сетчатки, состояние которого при диабетической ретинопатии изучено крайне недостаточно [17]. Свободные радикалы, дополнительно генерируемые при диабете в процессах аутоокисления глюкозы и гликозилирова-

ния белков, могут индуцировать перекисное окисление липидов не только в сосудистой системе, но и в мембранах клеточных и субклеточных структур сетчатки [2, 9, 18, 23, 28].

В настоящее время уделяется пристальное внимание изучению уровня оксидативного стресса в тканях глаза при развитии диабета, который может оказывать свое патогенное воздействие на ультраструктурные компоненты эпителия сетчатки [4, 13, 16, 22, 26]. В частности, это изучение продуктов перекисного окисления липидов у животных в условиях моделирования стрептозотоцинового диабета. Так, данные по изучению стабильности лизосомальных мембран пигментного эпителия сетчатки в условиях развития экспериментального (стрептозотоцинового) диабета свидетельствуют о повышении их лабильности. Это подтверждается возрастанием активности свободной формы кислой фосфатазы в различные сроки наблюдения [7, 14, 19].

Таким образом, повреждение ультраструктурной организации пигментного эпителия сетчатки при развитии экспериментального диабета можно рассматривать как одно из существенных звеньев механизма развития диабетической ретинопатии [3, 9, 28].

Поэтому нам представляется целесообразным изучение корригирующего медикаментозного воздействия на лизосомальную лабильность пигментного эпителия, обусловленную нарушением соотношения интенсивности процессов свободно-радикального окисления и потенциала антиоксидантной системы при ДР.

Результаты представленных исследований можно рассматривать как рекомендацию для профилактической и медикаментозной коррекции оксидативного стресса тканей глаза в общем, а также для стабилизации лизосомальных мембран пигментного эпителия сетчатки при диабетической ретинопатии, в частности.

Целью данной работы является экспериментальное изучение влияния различных медикаментозных препаратов (ацетилцистеина, биофлавоноида и таурина) на активность маркерного лизосомального фермента кислой фосфатазы в сетчатке белых крыс со стрептозотоциновым диабетом.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Исследования проводились на белых крысах линии Вистар массой 190 — 210 г.

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

Всего в работе было использовано 70 животных. Крысы были разделены на две группы: нормальную — 14 животных, и диабетическую — 56 животных. Диабетическая группа делилась на четыре подгруппы: «диабет без препаратов» (БП) — 14 животных и три группы «диабет с лечением» (42 животных). Применялось три вида медикаментозного воздействия: введение ацетилцистеина («АЦЦ» — 14 животных), биофлавоноида («ФЛ» — 14 животных) и таурина («ТАУ» — 14 животных).

Диабет вызывали путем инъекции стрептозотцина (55 мг на 1 кг веса тела, интраперитонеально). Инсулин вводился диабетическим животным с целью предотвращения снижения веса при условии поддержании гипергликемии (уровень сахара в крови колебался в пределах 20 — 25 мМ) [11].

По истечению двух месяцев развития диабета часть животных, находящихся в различных условиях эксперимента, а также нормальных крыс (контроль) декапитировали с предшествующей анестезией тиопенталом натрия (50

мг препарата на кг веса). Глаза энуклеировали на льду при температуре 0 — 5 °С.

Сетчатка немедленно удалялась и помещалась в свежеприготовленную среду выделения митохондрий. Сетчатки из двух глаз каждого животного объединялись и суспендировались в буфере, содержащем 20 мМ HEPES-КОН (рН=7,5), 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ EGTA и 250 мМ сахарозы, содержащей поливинилпиролон.

Сетчатки аккуратно гомогенизировались в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Полученный гомогенат центрифугировался при 750 g в течение 10 минут при 4 °С для удаления ядер и неразрушенных клеток. Супернатант затем был центрифугирован при 10 000 g в течение 15 минут. Полученный осадок митохондрий был ресуспендирован и использовался для биохимических анализов — определения белка и активности митохондриальных ферментов [24]. Активность различных форм маркерного лизосомального фермента — кислой фосфатазы — в сетчатке определялась с помощью методов спектрофотометрического анализа [6, 10].

По истечению шести месяцев развития диабета оставшаяся часть животных, все еще находящаяся в различных условиях эксперимента, также забивалась в соответствии с правилами работы с экспериментальными животными. Удаленная сетчатка животных сразу же подвергалась вышеописанным экспериментальным действиям.

Полученные данные обрабатывали согласно статистическому пакету SPSS 11.0 [5].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.** Данные, полученные при изучении различных способов коррекции стабильности лизосомальных мембран сетчатой оболочки белых крыс с экспериментальным диабетом, представлены в таблице 1 и на диаграммах (рис. 1 — 2).

Согласно полученным экспериментальным данным, показатель активности *свободной формы* кислой фосфатазы в группах сравнения «Диабет 2 мес б/п» и «Диабет 6 мес б/п» составил 142,1 % и 153,8 %, соответственно, по отношению к группе «Норма б/п».

Таблица 1

Показатели активности маркерного лизосомального фермента кислой фосфатазы в сетчатке белых крыс со стрептозотоциновым диабетом в условиях воздействия различных медикаментозных препаратов: ацетилцистеина (АЦЦ), биофлавоноида (ФЛ) и тауфона (ТАУ).

Форма		Контроль				Диабет 2 мес				Диабет 6 мес			
		Б/П	АЦЦ	ФЛ	ТАУ	Б/П	АЦЦ	ФЛ	ТАУ	Б/П	АЦЦ	ФЛ	ТАУ
Свободная	М	109,09	110,0	99,44	116,13	155,0	127,44	135,0	145,75	167,78	141,44	152,22	163,13
	m	4,36	7,20	5,68	7,00	3,65	5,20	3,13	4,17	6,19	3,93	4,65	2,65
	p <sub>1</sub>	—	—	—	—	<0,001	>0,05	<0,0001	<0,01	<0,0001	<0,001	<0,0001	<0,0001
	p <sub>2</sub>	—	>0,05	>0,05	>0,05	—	<0,001	<0,001	>0,05	—	<0,01	>0,05	>0,05
	%	100,0	100,1	91,2	106,5	100,0	82,2	87,1	94,0	100,0	84,0	90,7	97,2
Общая	М	160,91	169,38	171,68	155,0	180,0	169,0	166,88	170,63	186,67	183,33	186,11	187,50
	m	3,22	3,71	5,90	4,73	4,01	4,97	2,98	3,95	4,86	3,63	3,20	2,31
	p <sub>1</sub>	—	—	—	—	<0,01	>0,05	>0,05	<0,05	<0,001	<0,05	>0,05	>0,05
	p <sub>2</sub>	—	>0,05	>0,05	>0,05	—	>0,05	<0,05	>0,05	—	>0,05	>0,05	>0,05
	%	100,0	105,3	106,7	96,3	100,0	93,9	92,7	94,8	100,0	98,2	99,7	100,4
Связанная	М	51,81	59,38	72,22	38,88	25,0	41,56	31,88	24,88	18,89	41,89	33,89	24,38
	m	2,16	5,13	4,26	5,07	1,29	1,46	2,10	1,34	2,32	1,16	1,82	1,48
	p <sub>1</sub>	—	—	—	—	<0,0001	<0,01	<0,0001	<0,05	<0,0001	<0,001	<0,0001	<0,05
	p <sub>2</sub>	—	>0,05	<0,001	<0,05	—	<0,001	<0,05	>0,05	—	<0,0001	<0,001	>0,05
	%	100,0	114,6	139,4	75,0	100,0	166,2	127,5	99,5	100,0	221,8	179,4	129,1

Примечание: p<sub>1</sub> — уровень значимости достоверных различий по отношению к контролю;

p<sub>2</sub> — уровень значимости достоверных различий в каждой группе при применении препаратов и без применения

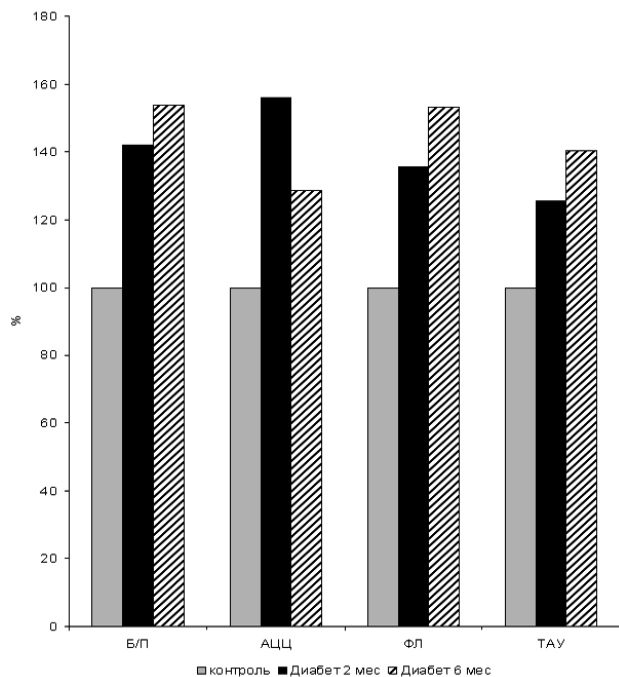


Рис. 1. Относительные изменения активности кислой фосфатазы свободной формы в различных условиях эксперимента (норма, диабет 2 мес, диабет 6 мес) и воздействия препаратов (ацетилцистеина, биофлавоноида и таурина).

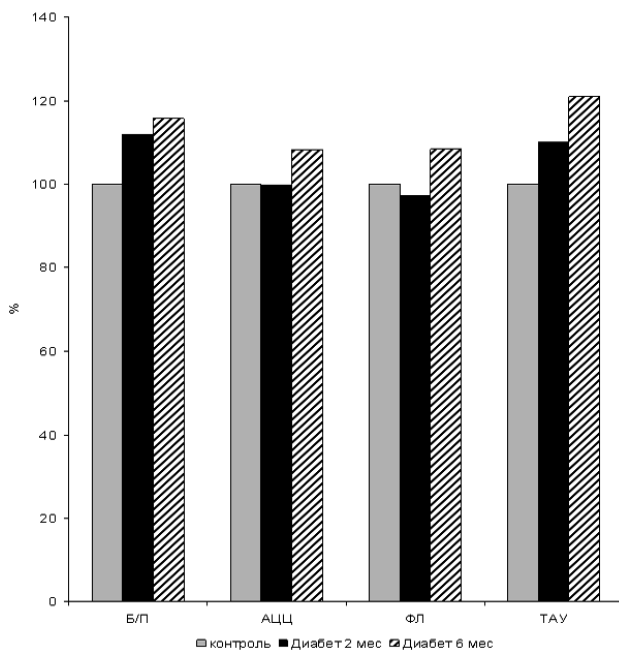


Рис. 2. Относительные изменения активности кислой фосфатазы общей формы в различных условиях эксперимента (норма, диабет 2 мес, диабет 6 мес) и воздействия препаратов (ацетилцистеина, биофлавоноида и таурина).

Показатель *связанной формы* маркерного фермента в аналогичных группах сравнения составил 48,3 % и 41,7 %, соответственно, по отношению к группе «Норма б/п».

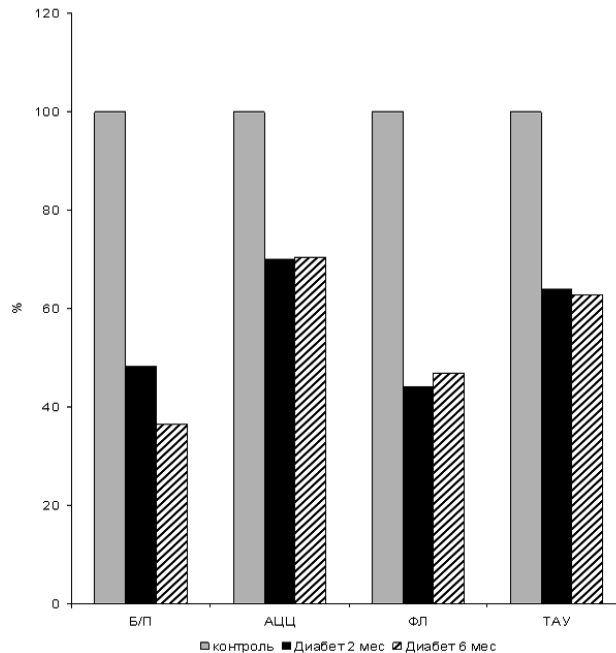


Рис. 3. Относительные изменения активности кислой фосфатазы связанной формы в различных условиях эксперимента (норма, диабет 2 мес, диабет 6 мес) и воздействия препаратов (ацетилцистеина, биофлавоноида и таурина).

Таким образом, при развитии стрептозотического диабета у животных в цитозоле увеличивается количество свободной формы кислой фосфатазы в связи с повышенной лабильностью мембран субклеточных структур, и тем самым уменьшается количество связанной формы этого фермента в лизосомах.

При этом *общая* активность кислой фосфатазы достоверно не изменялась.

Особый интерес вызывают внутригрупповые сравнения в группах «Диабет 2 мес» и «Диабет 6 мес» в зависимости от воздействия различных медикаментозных препаратов (ацетилцистеина, биофлавоноида и таурина).

Как видно из представленных данных (табл. 1 и рис. 1), активность *свободной формы* кислой фосфатазы в диабетических группах при введении ацетилцистеина (АЦЦ) соответствовала 82,2 % через 2 месяца и 84,7 % через 6 месяцев по отношению к группе «Диабет б/п». В данном случае прослеживается выраженное снижение уровня свободной формы маркерного фермента в терапевтических группах по сравнению с диабетической группой контроля на 17,8 % в первый срок и на 15,3 % во второй срок эксперимента. Таким образом, под воздействием мембранно-стабилизирующего влияния АЦЦ происходит существенное снижение выхода маркерного фермента кислой фосфатазы из лизосом в цитозоль.

Аналогичное действие отмечалось и при использовании в эксперименте биофлавоноида (ФЛ). Так, показатель активности свободной формы мар-

кернаго фермента в экспериментальных группах с применением этого препарата составлял 87,1 % через 2 месяца и 91,1 % через 6 месяцев эксперимента по отношению к группе «Диабет б/п». Следовательно, снижение выхода кислой фосфатазы в цитозоль было на 12,9 % ниже через 2 месяца эксперимента по сравнению с диабетической группой без лечения, и на 8,9 % ниже через 6 месяцев эксперимента.

При исследовании *связанной формы* кислой фосфатазы в эксперименте нами было также отмечено мембранно-стабилизирующее действие изучаемых препаратов на лизосомы сетчатки. При применении АЦЦ через 2 и 6 месяцев экспериментального диабета активность связанной формы кислой фосфатазы составляла 141,3 % и 152,8 %, соответственно, по отношению к группе «Диабет б/п». Таким образом, показательным является повышение связанной активности фермента в лизосомах при лечении через 2 месяца эксперимента на 41,3 % по сравнению с диабетической группой без лечения и на 52,8 % через 6 месяцев развития заболевания в сравнении с той же группой контроля.

При применении биофлавоноида (ФЛ) через 2 месяца эксперимента показатель активности связанной формы маркерного фермента в сетчатке белых крыс составил 127,5 %, а через 6 месяцев — 130,1 % по отношению к группе «Диабет б/п». Через 2 месяца экспериментального диабета показатель связанной формы фермента увеличился по сравнению с таковым показателем группы контроля на 27,5 %, а через полгода — на 30,1 %.

При применении препарата «Тауфон» показатели как свободной, так и связанной форм кислой фосфатазы изменялись незначительно по отношению к группе сравнения «Диабет б/п».

Таким образом, наиболее выраженное антиоксидантное действие, достоверно препятствующее лабилизации лизосом и повышению уровня свободной формы маркерного фермента кислой фосфатазы в цитозоле, характерно для ацетилцистеина и биофлавоноида.

При экспериментальном развитии стрептозотоцинового диабета основная роль в защите от окислительного стресса нейроэпителлия сетчатки отводится пигментному эпителию. Нарушения ультраструктурной организации последнего при диабете зависят от свободно-радикального окисления липидов, в результате которого нарушается баланс между антиоксидантным потенциалом сетчатой оболочки и интенсивностью образования свободных радикалов. Это в свою очередь приводит к нарушению мембранных структур таких внутриклеточных оргanelл пигментного эпителия, как лизосомы.

Наблюдаемые нами в эксперименте изменения лабильности лизосомальных мембран приводили к количественному изменению маркерного фер-

мента кислой фосфатазы как в лизосомах, так и в цитозоле. О стабильности лизосомальных мембран судили по соотношению связанной активности (седиментируемой при осаждении лизосом) и свободной формы фермента (неседиментируемой при осаждении лизосом).

Можно также отметить, что в норме действие вышеуказанных препаратов не оказывало выраженного влияния на лизосомы сетчатки животных, что подтверждает избирательность воздействия применяемых препаратов на дисфункции, происходящие внутри клетки.

## ВЫВОДЫ

1. При моделировании стрептозотоцинового диабета наблюдаются изменения в лабильности лизосомальных мембран, что приводит к увеличению в цитозоле свободной формы маркерного фермента кислой фосфатазы и уменьшению связанной формы этого фермента в лизосомах.

2. Использование ацетилцистеина и биофлавоноида при моделировании экспериментального стрептозотоцинового диабета оказывает выраженное защитное действие — повышает стабильность мембран лизосом, о чем говорит снижение уровня свободной формы маркерного фермента кислой фосфатазы в цитозоле.

3. В норме действие ацетилцистеина и биофлавоноида не оказывает выраженного влияния на лизосомы сетчатки животных, что свидетельствует об избирательности воздействия вышеуказанных препаратов на внутриклеточные изменения мембран при оксидативном стрессе.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Великий М. М., Бурда В. А., Биронт и др. Влияние никотинамида на активность ферментов антиоксидантной защиты при экспериментальном диабете // Укр. Биохим. журн. — 1996. — Т. 68. — № 2. — С. 109–114.
2. Кравчук Е. А. Роль свободнорадикального окисления в патогенезе заболеваний глаз // Вестник офтальмологии. — 2004. — № 5. — С. 48–51.
3. Леус Н. Ф. Метаболические механизмы развития и перспективы медикаментозного лечения диабетической ретинопатии // Офтальмол. журн. — 2003. — № 5. — с. 75–80.
4. Михейцева И. Н., Кашинцева Л. Т. Оксидантный и антиоксидантный статус больных с диабетическими изменениями глазного дна и его коррекция препаратом липохромин // Офтальмол. журн. — 2001. — № 2. — С. 29–32.
5. Наследов А. SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках. // Спб.: Питер, 2005. — 416 с.
6. Новые методы биохимического анализа. // Изд. Ленинградского универ. — 1991. — 395 с.
7. Недосугова Л. В., Ланкин В. З., Балаболкин М. И. Взаимосвязь между компенсацией углеводного об-

- мена и выраженностью проявлений окислительного стресса при сахарном диабете 2 типа // Бюллетень экспер. биол. и мед. — 2003. — Т. 136. — № 8. — С. 152–155.
8. **Олейник Т. В.** Исследование глутатиона в сетчатке крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом // Офтальмол. журн. — 2004. — № 5. — С. 65–69.
  9. **Павлюченко К. П., Олейник Т. В.** Окислительное повреждение пигментного эпителия сетчатки при моделировании стрептозотоцинового диабета // Офтальм. журн. — 2005. — № 3. — С. 47–49.
  10. **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.
  11. **Полтораков В. В., Блох К. О., Малашенко А. М.** Экспериментальное моделирование сахарного диабета для изучения специфического эффекта новых антидиабетических веществ / Методические рекомендации. — Харьков. — 1991. — 19 с.
  12. **Трженицкий С. Д., Красько М. П.** Состояние гормонального, углеводного, липидного обменов и свободно-радикального окисления у животных с экспериментальным диабетом // Экспер и клин. физиология и биохимия. — 2001. — № 2. — С. 83–88.
  13. **Aksoy N., Vural H., Sabuncu T.** Effects of melatonin on oxidative-antioxidative status of tissues in streptozotocin-induced diabetic rats / Cell Biochem Funct. — 2003. — V. 21 (2). — P. 121–125.
  14. **Aliciguzel Y., Ozen I., Aslan M.** Activities of xanthine oxidoreductase and antioxidant enzymes in different tissues of diabetic rats / J Lab Clin Med. — 2003. — V. 142 (3). — P. 172–177.
  15. **Bains J. S., Shaw C. A.** Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death / Brain Res. — 1997. — V. 25 (3). — P. 335–358.
  16. **Bayness J. W.** Role of oxidative stress in development of complications in diabetes / Diabetes. — 1991. — V. 40. — P. 405–412.
  17. **Bergmeyer H. U.** Methoden der enzymatischen Analyse. — Herausgegeben von H. U. Bergmeyer. — Berlin. — 1986. — S. 2254 — 2265.
  18. **Cai J., Nelson K. C., Wu M.** Oxidative damage and protection of the RPE / Prog Retin Eye Res. — 2000. — V. 19 (2). — P. 205–221.
  19. **Dierckx N., Horvath G., van Gils C.** Oxidative stress status in patients with diabetes mellitus: relationship to diet / Eur J Clin Nutr. — 2003. — V. 57 (8). — P. 999–1008.
  20. **Feillet-Coudry C., Rock E., Coudry C.** Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental diabetes / Clin Chim Acta. — 1999. — V. 284. — P. 31 — 43.
  21. **Hammes H. P., Du X., Edelstein D.** Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy // Nat. Med. — 2003. — № 9. — P. 249–299.
  22. **Martin-Gallan P., Carrascova A., Gussinye M.** Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications / Free Radic Biol Med. — 2003. — V. 34 (12). — P. 1563–1574.
  23. **Merzouk S., Hichami A., Madani S.** Antioxidant status and levels of different vitamins determined by high performance liquid chromatography in diabetic subjects with multiple complications / Gen Physiol Biophys. — 2003. — V. 22. — № 1. — P. 15–27.
  24. **Nishikawa T., Edelstein D., Du X. L.** Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. // Nature. — 2000. — Vol. 404. — P. 787 — 790.
  25. **Reyk D. M., Gillies M. C., Davies M. J.** The retina: oxidative stress and diabetes / Redox Rep. — 2003. — V. 8 (4). — P. 187–192.
  26. **Scutt F., Bergmann M., Holz F. G.** Isolation of intact lysosomes from human RPE cells and effects of A2-E on the integrity of the branes / Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. — 2002. — V. 240. — P. 983–988.
  27. **Speicher M. A., Danis R. P., Criswell M.** Pharmacologic therapy for diabetic retinopathy / Expert Opin Emerg Drugs. — 2003. — V. 8 (1). — P. 239–250.
  28. **Timmers M. M., Dratz E. A., Grip W. J.** A new isolation procedure for retinal pigment epithelium / IOVS. — 1984. — V. 9. — P. 113.
  29. **Ulusu N. N., Sahilli M., Avci A.** Pentose phosphate pathway, glutathione-dependent enzymes and antioxidant defense during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs: effects of stobadine and vitamin E / Neurochem Res. — 2003. — V. 28 (6). — P. 815–823.
  30. **Yildirim O., Buyukbingol Z.** Effects of supplementation with a combination of cobalt and ascorbic acid on antioxidant enzymes and lipid peroxidation levels in streptozotocin-diabetic rat liver / Biol Trace Elem Res. — 2002. — V. 90 (1–3). — P. 143–154.
  31. **Zhou J., Yang J., Yue L.** Research on nitric oxide, oxidative and lipid peroxidative parameters in blood of diabetic patients / Wei Sheng Yan Jiu. — 1999. — V. 28 (5). — P. 271–273.

Поступила 28.03.2010.

Рецензент д-р мед. наук Н. Ф. Леус

STUDY OF THE STABILITY OF THE RETINAL LYOSOMAL MEMBRANES OF WHITE RATS WITH STREPTOSOCIN DIABETES UNDER THE CONDITIONS OF DRUG INFLUENCE (ACETYL CYSTEINE, FLAVONOID AND TAURINE)

Gladush T. I., Baidan E. I.

Odessa, Ukraine

The study of the influence of sulfur-preparations and flavonoids on the state of the lysosomal membranes in the retina of white rats with streptozotocin diabetes has been conducted. The changes of lability in the retinal lysosomal membranes were revealed in development of experimental diabetes; the application of acetylcysteine and bioflavonoid resulted in the increase of the lysosomal membrane stability: the level of free form of enzyme — acid phosphatase reduced in the cytosole cellular structures of the retina.