

Влияние кверцетина и липоата на систему глутатиона в сетчатке при моделировании диабета

О. А. Мороз, канд. мед. наук

Закарпатская областная
клиническая больница им.
А. Новака, офтальмологическое
отделение (Ужгород, Украина)

E-mail: moroz.oleg@gmail.com

Ключевые слова: сетчатка, стрептозотоциновый диабет, глутатион, кверцетин, липоевая кислота, эксперимент

Ключові слова: сітківка, стрептозотоциновий діабет, глутатіон, кверцетин, ліпоєва кислота, експеримент

Введение. В связи с тем, что число больных сахарным диабетом увеличивается, диабетическая ретинопатия стала одной из ведущих причин слепоты [1].

Отсутствие четких представлений о механизмах развития основных осложнений сахарного диабета тормозит разработку эффективных методов терапии и профилактики диабетической ретинопатии [3, 12, 16].

В этой связи в настоящее время развернут широчайший фронт исследований, направленных на выяснение ключевых молекулярных механизмов диабетической ретинопатии, так как только на этом направлении возможен осмысленный поиск действенных методов лечения и профилактики этого заболевания [7, 17, 20, 22].

Необходимо отметить, что до последнего времени основное внимание в патогенезе диабетической ретинопатии уделялось конечным продуктам гликозилирования, тогда как ранее метаболические нарушения, приводящие к накоплению оксоальдегидов и снижению потенциала антиоксидантной системы, рассматривались как дополнительные факторы в патогенезе этого заболевания. В данное время достигнут значительный прогресс в изучении молекулярных основ диабета и сопутствующих ему осложнений, а

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

Мета. Вивчити вплив кверцетину і ліпоата на систему глутатіону в сітківці в процесі розвитку діабету (через два і шість місяців).

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 відновленого і окисненого глутатіону.

Результати. Застосування ліпоєвої кислоти і кверцетину дозволило підвищити рівень відновленого глутатіону на 107,2 і 84,3 % через 2 місяці досліджень, і на 134,8 % і 113,0 через 6 місяців після розвитку діабету в порівнянні з групою тварин, що не отримували препарати.

Висновок. При розвитку стрептозотоцинового діабету виявлено зниження коферментної (відновленої) форми глутатіону на 61,9 % (через 2 місяці) і на 68,3 % (через 6 місяців). Застосування препаратів ліпоєвої кислоти і кверцетину нормалізує метаболізм сітківки, що проявляється в підвищенні рівня відновленого глутатіону на 107,2 і 84,3 % (через 2 місяці) і на 134,8 і 113,0 % (через 6 місяців). Застосування ліпоєвої кислоти справляє більш виражений нормалізуючий ефект на рівень глутатіону.

также раскрыта роль ранних продуктов этого процесса. Установлено, что высокий уровень глюкозы вызывает цепь метаболических нарушений как внутри клеток, так и в экстрацеллюлярном пространстве [5, 13, 19]. В качестве пусковых метаболических нарушений, приводящих к поражению сосудистой нервной и других тканей организма рассматривается повышенный уровень не только глюкозы, но и целого ряда метаболитов углеводнофосфорного и липидного обменов, таких как метилглиоксаль, ацетоацетат, диацилглицерин, дезоксиглюкоза и другие. Повышение концентрации этих метаболитов не только отрицательно отражается на состоянии обмена веществ, но и вызывает нарушения регуляции обмена и функции клеток. Происходит резкая активация процессов свободно-радикального окисления, при этом антирадикальная система организма не в состоянии полностью обезвредить токсические радикалы, вследствие чего их избыточное количество повреждает мембранные структуры, белки, липиды, нуклеиновые кислоты и т. д. [2, 4, 14].

Важнейшим звеном детоксикационной системы организма и тканей глаза, в частности — обезврежи-

вающей вышеназванные токсические метаболиты и гасящей свободные радикалы, является окислительно-восстановительная система глутатиона [18].

Защитная роль этого трипептида заключается не только в детоксикационных и антиоксидантных функциях, но также обусловлена участием глутатиона в регуляции воспалительных и иммунных процессов и его противовирусным действием [21].

Учитывая детоксикационные и мембраностабилизирующие свойства глутатиона, его уровень играет важную роль в обеспечении защитно-приспособительных механизмов внутриглазных структур при патологических состояниях [18].

В то же время данные, полученные в отношении этой системы при развитии диабета, в целом ряде случаев противоречивы, а при диабетической ретинопатии — крайне недостаточны.

Так, в частности, в экспериментальных исследованиях было установлено, что в начальный период развития стрептозотоцинового диабета через 28 дней в сетчатке глаз экспериментальных животных отмечается резкое снижение содержания глутатиона, главным образом, за счет падения концентрации ее восстановленной формы. Отмеченные нарушения глутатионовой системы в сетчатке глаз животных при моделировании диабета, несомненно, можно рассматривать как важнейшее звено патогенеза диабетической ретинопатии [9, 11].

Необходимо отметить, что важную роль играет стимуляция глутатион-пероксидазной реакции, обезвреживающей гидроперекиси липидов, уровень которых при диабете, как известно, значительно возрастает [10].

В связи с этим актуальным представляется изучить уровень окисленной и восстановленной форм глутатиона в сетчатой оболочке глаз в более отдаленные сроки (через два и шесть месяцев) развития экспериментального диабета, когда уже отмечаются отчетливые признаки диабетической ретинопатии.

Цель работы: изучить влияние кверцетина и липоата на систему глутатиона в сетчатке в процессе развития диабета (через два и шесть месяцев).

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.

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

Работа с животными проводилась с учетом Международных руководящих принципов для биомедицинских ис-

следований с участием животных, предложенных на Совете международных медицинских научных организаций (2012 г.).

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

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 кг массы). Глаза энуклеировали на льду при температуре 0–5°C.

Через шесть месяцев развития диабета оставшаяся часть животных, все еще находящихся в различных условиях эксперимента, также забивалась согласно соответствующим правилам. Удаленная сетчатка животных сразу же поступала на исследование. В гомогенатах сетчаток производили определение содержания восстановленного и окисленного глутатиона.

Принцип метода определения восстановленного глутатиона основан на реакции между глутатионом и метилглиоксалем под влиянием фермента глиоксилазы, приводящей к образованию конъюгата S-лактоилглутатиона, имеющего максимум поглощения при длине волны 240 нм.

Принцип метода определения окисленной формы глутатиона заключается в ферментативном восстановлении окисленного глутатиона глутатионредуктазой с помощью восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотид-фосфата (НАДФН), убыль которого регистрируют спектрофотометрически при длине волны 340 нм.

Среднее значение коэффициента вариации для указанного диапазона восстановленной формы — 4,0 %, окисленной формы — 5,0 %. Для измерений использовали спектрофотометр СФ-26 [8, 15].

Полученные данные подвергали статистической обработке с помощью пакета SPSS 11.0 [6].

Результаты и их обсуждение

Данные о содержании восстановленного и окисленного глутатиона в сетчатке белых крыс со стрептозотоциновым диабетом через 2 месяца при воздействии липоевой кислоты и кверцетина отражены в таблице 1.

Как видно из представленных данных, содержание восстановленного глутатиона в сетчатке животных с диабетом без применения препарата было понижено на 61,9 % по отношению к норме ($2,18 \pm 0,16$) мкмоль/г.

В условиях применения липоевой кислоты через два месяца после развития диабета содержание восстановленного глутатиона в сетчатке было повышено до ($1,72 \pm 0,13$) мкмоль/г, т. е. по сравнению с группой «без препарата» ($0,83 \pm 0,06$) мкмоль/г повысилось на 107,2 % ($p < 0,001$).

При применении кверцетина содержание восстановленного глутатиона повысилось на 84,3 % ($1,53 \pm 0,12$) мкмоль/г по отношению к группе животных, не получавших препарат ($p < 0,001$).

Через два месяца развития диабета при применении липоевой кислоты отмечается снижение содержания окисленного глутатиона в сетчатке до ($0,48 \pm 0,04$) мкмоль/г, что составило 87,3 % по

Таблица 1. Содержание восстановленного и окисленного глутатиона в сетчатке белых крыс со стрептозотоциновым диабетом через два месяца при воздействии липоевой кислоты и кверцетина (мкмоль/г).

Биохимические показатели	Стат. показатели	Норма n=14			
			Без препарата n=14	Липоевая кислота n=12	Кверцетин n=15
Восстановленный глутатион	M	2,18	0,83	1,72	1,53
	m	0,16	0,06	0,13	0,12
	p ₁	–	<0,001	<0,05	<0,01
	%1	100,0	38,1	78,9	70,2
	p ₂	–	–	<0,001	<0,001
%1	–	100	100	207,2	184,3
Окисленный глутатион	M	0,46	0,55	0,48	0,49
	m	0,03	0,03	0,04	0,04
	p ₁	–	<0,05	>0,05	>0,05
	%1	100,0	119,6	104,3	106,5
	p ₂	–	–	>0,05	>0,05
%1	–	100,0	87,3	89,1	
Восстановленный глутатион / окисленный глутатион		4,74	1,51	3,58	3,12

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

сравнению с группой «без препарата» (0,55±0,03) мкмоль/г.

В условиях воздействия кверцетина содержание окисленного глутатиона понизилось по отношению к группе животных без препарата на 10,9 %, т.е. (0,49±0,04) мкмоль/г. Содержание окисленного глутатиона в группе животных без препарата было повышено на 19,6 % по сравнению с нормой (0,46±0,03) мкмоль/г.

Данные о содержании восстановленного и окисленного глутатиона в сетчатке белых крыс со стрептозотоциновым диабетом через шесть месяцев при воздействии липоевой кислоты и кверцетина представлены в таблице 2.

Через шесть месяцев после развития диабета и применения липоевой кислоты содержание восстановленного глутатиона в сетчатке было повышено до (1,62±0,14) мкмоль/г, т.е. по сравнению с группой «без препарата» (0,69±0,04) мкмоль/г увеличилось на 134,8 % (p<0,001).

При воздействии кверцетина содержание восстановленного глутатиона было повышено на 113,0 %, что составило (1,47±0,13) мкмоль/г по отношению к группе животных без препарата (p<0,001). Содержание восстановленного глутатиона в группе животных с диабетом без применения препарата было понижено на 68,3 % по отношению к норме (2,18±0,16) мкмоль/г.

Содержание окисленного глутатиона в сетчатке при экспериментальном развитии диабета и применении липоевой кислоты было ниже-

Таблица 2. Содержание восстановленного и окисленного глутатиона в сетчатке белых крыс со стрептозотоциновым диабетом через шесть месяцев при воздействии липоевой кислоты и кверцетина (мкмоль/г).

Биохимические показатели	Стат. показатели	Норма n=14			
			Без препарата n=14	Липоевая кислота n=14	Кверцетин n=14
Восстановленный глутатион	M	2,18	0,69	1,62	1,47
	m	0,16	0,04	0,14	0,13
	p ₁	–	<0,001	<0,05	<0,01
	%1	100,0	31,7	74,3	67,4
	p ₂	–	–	<0,001	<0,001
%1	–	100	100	234,8	213,0
Окисленный глутатион	M	0,46	0,58	0,47	0,50
	m	0,03	0,04	0,03	0,04
	p ₁	–	<0,05	>0,05	>0,05
	%1	100,0	126,1	102,1	108,7
	p ₂	–	–	<0,05	>0,05
%1	–	100,0	81,0	86,2	
Восстановленный глутатион / окисленный глутатион		4,74	1,19	3,45	2,94

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

но до (0,47±0,03) мкмоль/г, т.е. составляло 81,0 % по отношению к группе диабетических животных без применения препарата (0,58±0,04) мкмоль/г (p<0,05).

В группе диабетических животных с применением кверцетина содержание окисленного глутатиона понизилось на 13,8 %, т.е. (0,50±0,04) мкмоль/г, по сравнению с группой «без препарата». Содержание окисленного глутатиона при диабете без препарата было повышено на 26,1 % по сравнению с нормой (0,46±0,03) мкмоль/г.

Анализ проведенных нами исследований свидетельствует о резком падении восстановительного потенциала глутатионовой системы, в первую очередь, за счет резкого снижения уровня восстановленной формы кофермента. Так, концентрация восстановленной формы глутатиона через два месяца развития диабета понижалась на 61,9 %, а через шесть месяцев – на 68,3 % без применения препарата.

Полученные данные позволяют полагать, что основными метаболическими мишенями, на которых следует сосредоточить внимание при разработке способов профилактики и лечения диабетического поражения сетчатки, является снижение потенциала антиоксидантной системы, в частности, понижение концентрации восстановленного глутатиона, способствующее накоплению продуктов перекисного окисления липидов в сетчатке и дезинтеграции внутриклеточных мембран пигментного эпителия сетчатки (лабилизации лизосом).

По нашему мнению, нормализация уровня глутатиона должна способствовать обезвреживанию метилглиоксаля в глиоксалазной реакции с использованием глутатиона. Также нормализация потенциала глутатионовой системы активирует процессы гашения свободно-радикальных соединений за счет восстановленной формы глутатиона.

На основании вышесказанного нами были проведены исследования по выяснению возможности коррекции описанных метаболических процессов с помощью препаратов липоевой кислоты и кверцетина.

Применение липоевой кислоты и кверцетина позволило повысить уровень восстановленного глутатиона на 107,2 и 84,3 % через два месяца исследований, и на 134,8 и 113,0 % через шесть месяцев после развития диабета по сравнению с группой животных, не получавших препараты. Следует от-

метить, что липоевая кислота оказывает более выраженный нормализующий эффект на концентрацию восстановленного глутатиона в сетчатке.

Выводы

1. При развитии стрептозотоцинового диабета выявлено снижение коферментной (восстановленной) формы глутатиона на 61,9 % (через 2 месяца) и на 68,3 % (через шесть месяцев).

2. Применение препаратов липоевой кислоты и кверцетина оказывает нормализующее действие на метаболизм сетчатки, что проявляется в повышении уровня восстановленного глутатиона на 107,2 и 84,3 % (через два месяца) и на 134,8 и 113,0 % (через шесть месяцев). Применение липоевой кислоты оказывает более выраженный нормализующий эффект на уровень глутатиона.

Литература

1. Гогіна І. Ф., Андрію Л. В., Огранович О. Є. Діабетичні ангіо-, ретіно-, нейропатії: патогенез, клініка, лікування. — Львів: Ліга прес. — 2000. — 186 с.
2. Кравчук Е. А. Роль свободнорадикального окисления в патогенезе заболеваний глаз // Вестник офтальмологии. — 2004. — № 5. — С.48–51.
3. Крыжановская Т. В. Патогенетические аспекты реабилитации больных диабетической ретинопатией // Матер. 2-ой Межд. Конф. «Современные аспекты сосудисто-эндокринных заболеваний органа зрения». — К., 2005. — С. 73–74.
4. Леус Н. Ф. Метаболические механизмы развития и перспективы медикаментозного лечения диабетической ретинопатии // Офтальмол. журн. — 2003. — № 5. — с. 75–80.
5. Мальцев Е. В., Родин С. С., Черняева С. Н. Диабетическая ретинопатия, механизмы развития // Офтальмол. журн. — 2003. — № 2. — С. 82–88.
6. Наследов А. SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках. // Спб.: Питер, 2005. — 416 с.
7. Недзвецкая О. В. Современные направления в лечении диабетической ретинопатии // Междунар. мед. журнал. — 2000. — № 3. — С. 56–58.
8. Новые методы биохимического анализа // Изд. Ленинградского универ. — 1991. — 395 с.
9. Олейник Т. В. Возможность коррекции уровня глутатиона в сетчатке при развитии стрептозотоцинового диабета // Офтальмол. журн. — 2007. — № 3. — С. 68–72.
10. Павлюченко К. П., Могилевский С. Ю., Чуйко А. Л. Состояние энзиматической антиоксидантной системы в сетчатке при экспериментальном диабете и применении витамина В₆ // Офтальмол. журн. — 2011. — № 3. — С. 73–78.
11. Павлюченко К. П., Олейник Т. В. Исследование глутатиона в сетчатке крыс со стрептозотоцининдуцированным диабетом // проблемы экологической и медицинской генетики и клинической иммунологии: Сборник научных трудов. Вып. 8 (61). — 2004. — С. 355–362.
12. Сидорова М. В. Диабетическая ретинопатия. Патогенез, клиника, лечение. — К.: СМП «АВЕРС», 2006. — 156 с.
13. Aiello L. P., Cahill M. T., Wong J. S. Systemic considerations in the management of diabetic retinopathy // Am. J. Ophthalmol. — 2001. — Vol.32. — P.760–776.
14. Bayness J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes // Diabetes. — 1991. — Vol.40. — P.405–412.
15. Bergmeyer H. U. Methoden der enzymatischen Analyse. — Herausgegeben von H. U. Bergmeyer. — Berlin, 1986. — 2220 p.
16. Brownlee M: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications // Nature. — 2001. — Vol.414. — P.813–820.
17. Dervan E., Lillis D., Flynn L. Factors that influence the patient uptake of diabetic retinopathy screening // Irish. J. Med. Sci. — 2008. — Vol.177. — P.303–308.
18. Dickinson D. A., Forman H. J. Cellular glutathione and thiols metabolism // Biochem. Pharmacol. — 2002. — Vol. 64. — P.1019–1026.
19. Fong D. S., Aiello L. P., Ferris F. L., Klein R. K. Diabetic retinopathy // Ophthalmol. — 2004. — Vol.27. — P.2540–2553.
20. Lang G. E. Pharmacological treatment of diabetic retinopathy // Ophthalmologica. — 2007. — Vol.221. — P.112–117.
21. Riley M., Meyer R., Yates E. Glutathione in the aqueous humor of human and other species // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 1980. — Vol.19. — P.94–96.
22. Speicher MA, Danis RP, Criswell M: Pharmacologic therapy for diabetic retinopathy // Expert Opin Emerg Drugs. — 2003. — Vol. 8 (1). — P.239–250.

Поступила 02.10.2015