

УДК 617.735+617.723:616.379-008.64-092.9-07+577.11

## СОСТОЯНИЕ СЕТЧАТОЙ И СОСУДИСТОЙ ОБОЛОЧЕК ГЛАЗА КРОЛИКА С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ, МОДЕЛИРОВАННЫМ ДИТИЗОНОМ. СООБЩЕНИЕ 3. PAS-ПОЗИТИВНЫЙ МАТЕРИАЛ

**Э. В. Мальцев**, проф., **А. В. Зборовская**, канд. мед. наук, **А. Э. Дорохова**, врач  
ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им В. П. Филатова НАМН Украины»

*На дитизоновій моделі діабетичної ретинопатії кролика показано, що нейродегенеративні зміни цієї майж аваскулярної сітківки виявляються в ядерних шарах та шарі гангліозних клітин і супроводжуються значними змінами в інших її шарах. Одночасно має місце зниження інтенсивності ШИК-реакції в об'єкті та зміна характеру відкладення її продуктів. Це вказує на порушення метаболізму різноманітних компонентів сітківки, які містять в собі вуглець.*

**Ключевые слова:** диабетическая ретинопатия, дитизоновый диабет, сетчатка, сосудистая оболочка, PAS-позитивный материал.

**Ключові слова:** діабетична ретинопатія, дитизоновий діабет, сітківка, судинна оболонка, PAS-позитивний матеріал.

**Введение.** Ранее нами было установлено, что диабетическая ретинопатия (ДР), развивающаяся в глазу кроликов в результате интоксикации хелатирующим агентом дитизином, характеризуется быстро прогрессирующей нейродегенерацией клеточных структур сетчатой оболочки. Нейродегенерация при этом сильно варьирует по степени своего проявления в различных ее участках [5, 6]. Далее оказалось, что в качестве патогенетически значимых факторов при этом патологическом состоянии является усиление свободно-радикальных процессов в сетчатой и сосудистой оболочках животных вследствие ослабления активности антиоксидантных ферментов в этих структурах, включая супероксиддисмутазу [4, 7]. В связи с полученными фактами естественным образом возник вопрос, а как же ведут себя в условиях развивающейся нейродегенерации углеводсодержащие химические компоненты сетчатой оболочки, поскольку именно патология углеводного обмена является ведущим проявлением сахарного диабета [9]?

Углеводы, и прежде всего глюкоза, не только утилизируются в катаболических реакциях гликолиза, цикла трикарбоновых кислот Кребса и терминальном окислении, но и входят в качестве структурных составляющих в состав гликолипидов, нейтральных глико- и мукопротеидов, гликогена и других важных химических веществ клеток и тканей (10). Одна из наиболее надежных и часто применяемых в гистохимических исследованиях методик – PAS (или ШИК)-реакция – как раз и позволяет получить наиболее общее представление

об углеводсодержащих компонентах клеток и межклеточного пространства или даже дать их количественную оценку при длине волны монохроматического света, равной 550 нм.

Поэтому целью данного этапа работы явилось исследование PAS-положительного материала в сетчатой и сосудистой оболочках глаза кролика с сахарным диабетом, моделированным дитизином.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Информация о методике моделирования сахарного дитизинового диабета у кроликов приведена в нашем сообщении 1 [6], в котором содержатся и все необходимые данные относительно количества использованных в опытах животных, сроков наблюдения за ними, а также приведено детальное гистологическое описание наблюдаемых морфологических изменений. Что же касается постановки PAS-реакции, результаты применения которой являются предметом настоящего сообщения, то использовалась методика Мак Мануса-Хочкисса в прописи, рекомендуемой В. В. Виноградовым [10]. Полученные гистохимические препараты микроскопировались под микроскопом Laboval-4 (Karl Zeiss, Jena), а сведения об особенностях их микрофотографирования изложены в нашем сообщении 2 [7].

Как показал предварительный просмотр изучаемых срезов, изменения уровней PAS-позитивного материала относительно здоровых животных в сетчатке, да и в сосудистой оболочке кролика с дитизиновым диабетом, носят столь резко выраженный характер, что какая-либо потребность в применении морфометрических полуколичественных, а тем более — количественных способов их оценки отпадает. Такие способы, как известно [1], целесообразно использовать в случаях изменения гисто-цитохимических

© Э. В. Мальцев, А. В. Зборовская, А. Э. Дорохова, 2012

показателей на какое-то количество процентов, десятков процентов, но не сдвиг уровней определяемых показателей в разы, а тем более во много раз, не говоря уже о необходимости учета вполне возможного изменения характера отложения конечного продукта самой реакции. Поэтому дальнейшее изложение результатов работы и носит описательный, словесный характер, как это и принято, впрочем, в большей части публикаций по гистохимии.

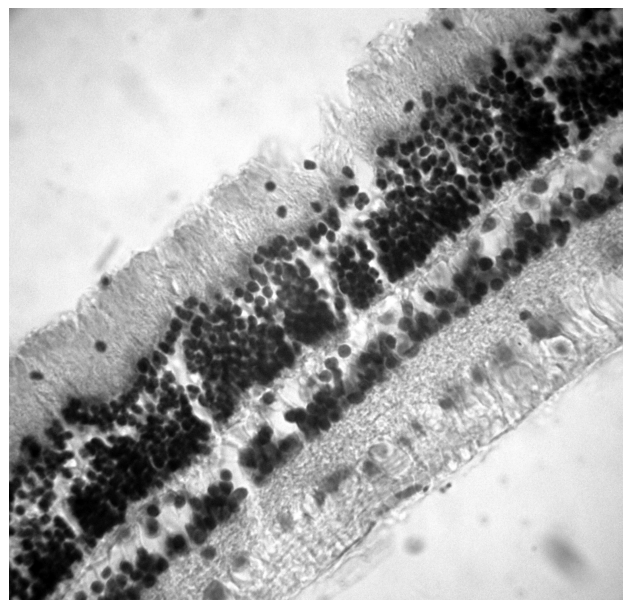
**РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ.** В сетчатой оболочке интактных животных ШИК-позитивный материал локализуется практически во всех ее слоях, правда, в неодинаковых количествах, на что указывает различная выраженность реакции. Интенсивная диффузная реакция определяется в фоторецепторах, причем в их наружных сегментах она более выражена, чем во внутренних, и достигает такого же уровня, что в наружном и внутреннем сетчатых слоях, слое нервных волокон и межклеточном пространстве ганглиозного слоя (рис. 1 и рис. 2). Во внутренних сегментах фоторецепторного слоя реакция слабее, чем в наружных, а по своей интенсивности она здесь такая же, как в наружном и внутреннем ядерных слоях. При этом как в ядерных слоях, так и в слое ганглиозных клеток PAS-позитивный материал локализуется в межклеточных пространствах и цитоплазме клеток, то есть обрамляя их ядра. Благодаря этому ядра клеток выглядят более светлыми на окружающем их фоне, что лучше заметно в ганглиозном слое (рис. 2). Для собственно сосудистой оболочки (рис. 3) характерна гораздо менее интенсивная ШИК-реакция чем в сетчатке (рис. 4), да и то определяется она, несколько усиливаясь к зубчатой линии, преимущественно, в стенках ее кровеносных сосудов. Последние, благодаря этому, контрастируются среди бледно окрашенной окружающей ткани. К слову, впрочем, такая же картина характерна и для других отделов сосудистого тракта глаза — цилиарного тела и радужной оболочки (рис. 5).

Спустя 6–7 часов после введения дитизона (фаза гипогликемии) какие-либо заметные структурные и гистохимические изменения в изучаемых оболочках глаза не определяются (рис. 6). Не нарушено их строение и через 33–36 часов после интоксикации хелатирующим агентом (начало фазы вторичной стойкой гипергликемии), но во внутренних сегментах фоторецепторов ШИК-реакция представляется несколько ослабленной (рис. 7). Однако в целом характер этой реакции соответствует тому, который присущ контрольным препаратам и подробно описан выше.

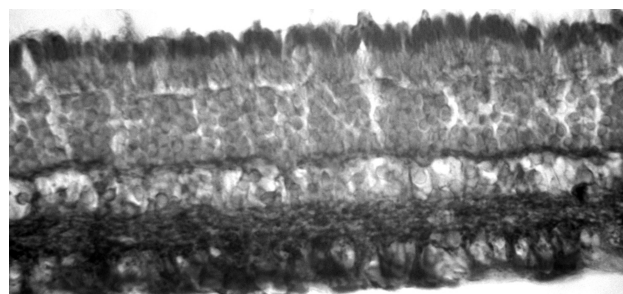
Совсем иная, по сравнению с характерной для только что описанной при ранних сроках наблюдения, гистологическая и гистохимическая картина открывается при изучении препаратов глаз животных с развитым диабетом. То есть спустя 16–17 недель после интоксикации их дитизоном. Что касается структурных изменений сетчатки (как по-

следствия выраженных нейродегенеративных процессов в ней), то вкратце они могут быть перечислены в следующем виде:

- разрушение (вплоть до полного исчезновения) слоя фоторецепторов;
- уменьшение количества рядов нейронов в обоих истонченных ядерных слоях;
- изреженность слоя ганглиозных клеток;
- истончение наружного сетчатого слоя или его отсутствие, вследствие чего нейроны наружного и внутреннего ядерных слоев могут перемешиваться между собой; аналогичное изменение внутреннего сетчатого слоя и слоя нервных волокон;
- разрастание глиальных элементов;
- волнистость внутренней поверхности сетчатки из-за ее неравномерной толщины, что связано с очаговыми атрофическими изменениями этой оболочки;
- деструкция слоя пигментного эпителия.



**Рис. 1.** Сетчатка глаза интактного кролика. Окр. гематоксилин-эозином. Об 40, ок16.



**Рис. 2.** PAS-позитивный материал в сетчатой оболочке глаза интактного кролика. PAS- реакция. Об 40, ок16.

Особо следует заметить, что перечисленные деструктивные и атрофические изменения отнюдь не

выражены равномерно по всей протяженности сетчатой оболочки, а носят очаговый характер (рис. 8).



Рис. 3. Собственно сосудистая оболочка глаза intactного кролика. Окр. гематоксилин-эозином. Об 100, ок 7.

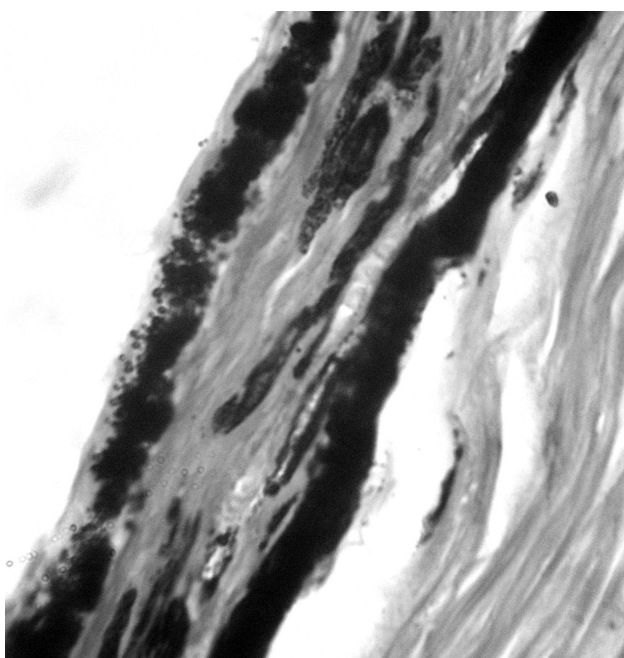


Рис. 4. PAS-положительный материал в собственно сосудистой оболочке (вблизи от зубчатой линии) глаза intactного кролика. PAS- реакция. Об 40, ок 16.

Что же касается углеводсодержащих компонентов сетчатки в рассматриваемом периоде наблюдения, то здесь представляется возможным легко констатировать их настолько глубокие изменения, что нарушается не только интенсивность

PAS-реакции, но и сам ее характер, присущие intactным животным. Прежде всего, обращает на себя внимание, что продукт реакции приобретает, в отличие от нормы, явно выраженный гранулярный характер. При этом размер образовавшихся гранул варьирует от мелких и мельчайших до крупных, локализация их довольно хаотичная, а по количеству их значительно больше поближе к сосудистой оболочке и в слоях ганглиозных клеток и нервных волокон. Особенно хорошо это заметно в более атрофированных участках сетчатой оболочки (рис. 9). Однако и в менее измененных ее местах, где еще сохраняется относительно выраженное слоистое строение, гранулярный материал также хорошо заметен, а локализация его довольно хаотична (рис. 10). И конечно, интенсивность окрашивания препаратов намного уступает контрольным объектам, причем это в одинаковой мере относится как к более, так и к менее утратившим свое нормальное строение участкам сетчатой оболочки. Относительно сосудистой оболочки лишь заметим, что ее PAS- положительное окрашивание в описываемом периоде наблюдения развития диабетической ретинопатии еще менее выражено, чем в нормальном состоянии, что и заметно, например, на ранее приведенных рисунках 9 и 10.

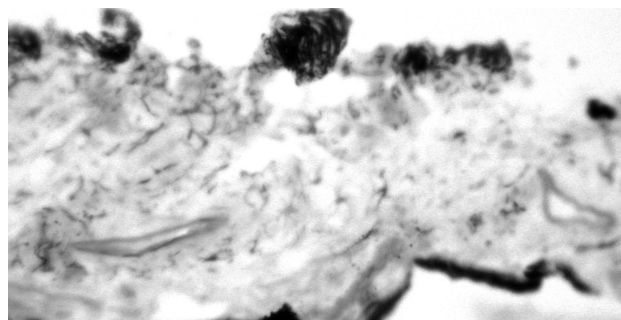
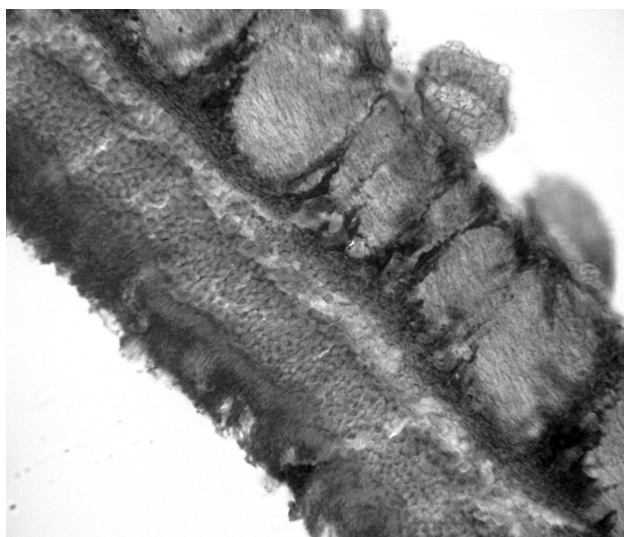


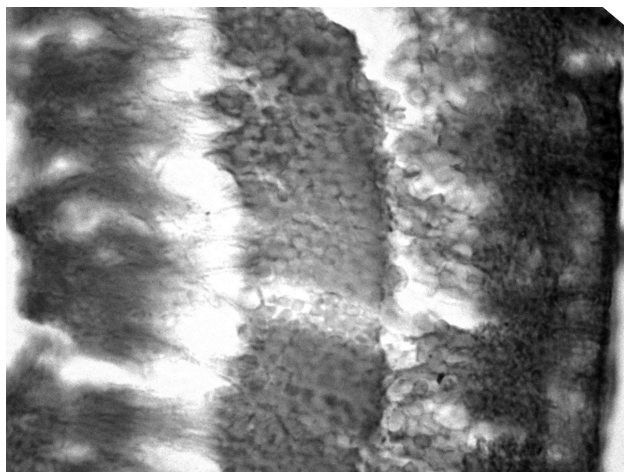
Рис. 5. PAS-положительный материал в радужной оболочке глаза intactного кролика. Усиление реакции в стенках двух кровеносных сосудов. PAS- реакция. Об 10, ок 16.

**ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.** Разумеется, морфологические изменения сетчатки при дитионовом сахарном диабете, подробно описанные нами ранее [5, 6], являются столь выраженными, что не могут не сочетаться с гистохимически регистрируемыми последствиями глубокого изменения ее метаболизма, которые и приводят к последующей деструктуризации ткани этой оболочки глаза. Одним из проявлений такой ситуации является нарушение характера и интенсивности PAS-реакции в изучаемом объекте. Здесь следует упомянуть, что в литературе имеется не так уж много сведений о результатах проведения этой реакции в сетчатой оболочке глаза человека и животных. Но в отношении глаза кролика такая информация как раз упоминается в таблице 13:2 капитального руководства по

использованию этого вида лабораторных животных в офтальмологии [19]. Из этой таблицы легко сделать заключение о наличии PAS-положительного материала во всех слоях сетчатки интактного глаза кролика, причем интенсивность этой реакции в них варьирует от слабой до умеренно выраженной. Отметим здесь, что в этом отношении имеется полное соответствие с нашими данными (касательно выявления такого материала) в той их части, которая относится к глазам контрольных кроликов.



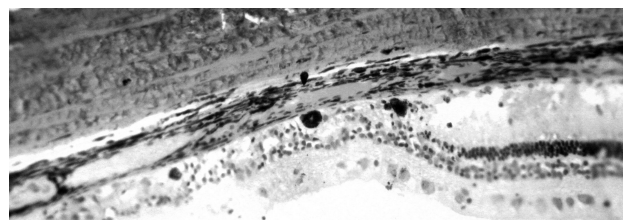
**Рис. 6.** PAS-положительный материал в сетчатой оболочке глаза кролика через 6–7 час после введения дитизона. PAS-реакция. Об.40, ок. 6.



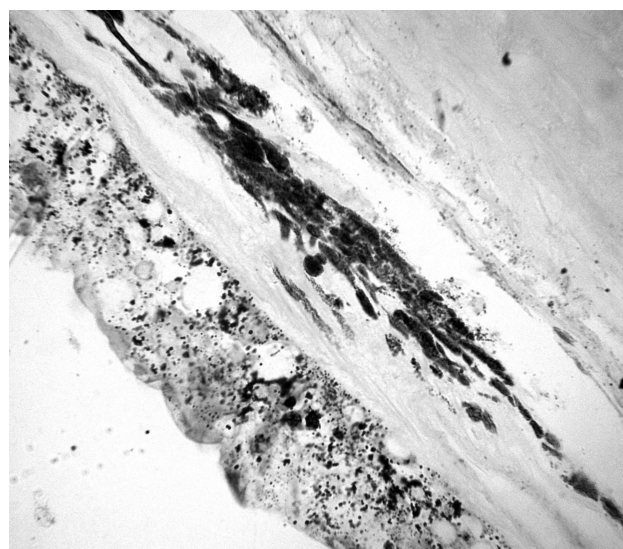
**Рис. 7.** PAS-положительный материал в сетчатой оболочке глаза кролика через 33–36 час после введения дитизона. PAS-реакция. Об.40, ок. 16.

В других публикациях сообщается, что среди PAS-положительного вещества в разных структурах сетчатки животных и птиц присутствуют кислые PAS-положительные мукополисахариды [15], гликоген [3, 16], гликопротеид опсин [11]. Другие исследователи сообщают также об умеренной PAS-

положительной реакции в фоторецепторах сетчатки [14], а равным образом в мембране Бруха и базальных мембранах сосудов хориоидеи [13].

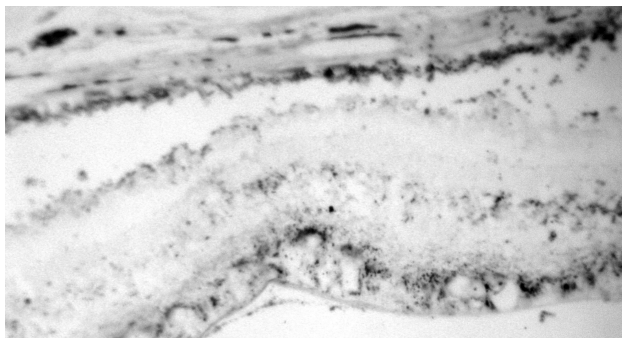


**Рис. 8.** Сетчатка глаза кролика через 16–17 недель после введения дитизона. Волнистость ее внутренней поверхности, обусловленная разной степенью выраженности атрофических и дегенеративных изменений. Скопления меланина на месте разрушившихся клеток пигментного эпителия. Заметны место утраты наружного сетчатого слоя, сосудистая и склеральная оболочки. Окр. гематоксилин-эозином. Об 10, ок 16.



**Рис. 9.** Гранулы PAS-положительного материала в атрофированном участке сетчатой оболочки глаза кролика через 16–17 недель после введения дитизона. PAS-реакция. Об 40, ок 7.

Что же касается состояния PAS-положительных веществ сетчатки и сосудистой оболочки при диабетической ретинопатии, то и здесь сведения литературы носят весьма неполный, отрывочный характер. Упомянется, в частности, о «вымывании» таких веществ из сетчатой оболочки глаза человека при диабетической ретинопатии [2], о чем авторы сообщили на основании биохимического исследования слезной жидкости у 80 пациентов. Естественно, что следствием подобного явления при проведении гистохимического исследования, как в нашем случае, окажется снижение интенсивности PAS-реакции в изучаемом объекте. Что мы и продемонстрировали на модели дитизинового диабета кролика.



**Рис. 10.** PAS-положительный материал в участке сетчатки с относительно слабо выраженными дегенеративными признаками. Сосудистая оболочка. В сохранившихся клетках пигментного эпителия остатки гранул меланина и PAS-положительное вещество. 16–17 недель эксперимента. PAS-реакция. Об. 10, ок.16.

Опубликованы и сведения об отсутствии PAS-положительных веществ в периваскулярном гиалинизированном пространстве, обрамляющем сосуды сетчатой и сосудистой оболочек глаза крыс линии WBN/Kob, у которых в возрасте от 12 до 24 месяцев развивалась гипергликемия и глюкозурия, а также отмечалась фокальная дегенерация и пролиферация пигментного эпителия сетчатки [20]. Авторы этой работы подчеркивают, что диабетическая ретинопатия у животных сопровождается хориоидальной ангиопатией, что и выносят даже в ее название. К сказанному об этой работе остается лишь добавить, что интенсивность PAS-реакции у наших диабетических кроликов оказалась пониженной не только в периваскулярных пространствах сосудистой оболочки, но и по всей ее протяженности. В двух публикациях другой группы авторов [17, 18] сообщалось, что в базальных мембранах капилляров (и только их!) сетчатки на ее тотальных переваренных препаратах наблюдалось, напротив, усиление PAS-реакции как при диабетической ретинопатии крыс, вызванной стрептозотоцином, так и при длительной диете, богатой галактозой.

Заключая работу, можно констатировать, что имеющиеся в литературе материалы, касающиеся PAS-положительных соединений сетчатой оболочки глаза при сахарном диабете, во-первых, немногочисленны, а во-вторых касаются, практически, только ее сосудистого русла. Логическое объяснение тому, на наш взгляд, найти не трудно, поскольку и сегодня диабетическую ретинопатию продолжают рассматривать исключительно как сосудистое осложнение диабета [12], в то время как материалы, свидетельствующие в пользу первичности поражения нервных (а не сосудистых!) элементов сетчатой оболочки при этом заболевании остаются сравнительно мало известными. Кстати, именно это обстоятельство и послужило поводом для появления в 2012 году нашего обзора на данную тему в одном из последних номеров «Офтальмологического жур-

нала» [8]. Поэтому в настоящем исследовании мы и сосредоточили основное внимание на описании локализации PAS-положительных веществ именно в нейрональных структурах сетчатки глаза кролика при диабетической ретинопатии. Как известно [19], эта сетчатка крайне слабо васкуляризирована, что и делает ее особенно удобной для данной цели. Хотя следует заметить, что на одном из приведенных выше рисунков (рис 6) хорошо заметны сосуды на внутренней поверхности мозгового луча сетчатой оболочки, стенки которых, как и клетки крови, PAS-положительны. Наконец, подчеркнем, что, поскольку PAS-положительный материал неоднороден, как это давно известно [10], и им являются гликолипиды, нейтральные глико- и мукопротеиды, гликополисахарид гликоген, сиаломукопротеиды, то можно констатировать лишь наличие каких-то их представителей в сетчатке, но без качественного и количественного анализа. Что мы и сделали в данном исследовании. Однако подобный анализ, безусловно, интересен, но может быть проведен только путем использования взаимосвязанных многочисленных гистохимических методик, например, по известной схеме В. В. Виноградова [10], состоящей из ряда этапов, причем дополненной современными иммуноморфологическими методами и изучением гликозаминогликанов. Разумеется, такая работа может быть выполнена в рамках отдельного трудоемкого и дорогостоящего исследования, которое, надеемся, будет, рано или поздно, проведено. Во всяком случае, дитизиновая модель сахарного диабета у кроликов для такого исследования, на наш взгляд, более предпочтительна по сравнению с иными существующими моделями этого заболевания.

### ЛИТЕРАТУРА

1. **Автандилов Г. Г.** Морфометрия в патологии. — М.: «Медицина». — 1973. — 247 с.
2. **Бахритдинова Ф. А., Камилова К. А.** Биохимические параметры оценки эффективности нейропротекторного лечения диабетической ретинопатии // Офтальмология. — 2010. — Т.7, № 3. — С. 46–49.
3. **Вит В. В.** Строение зрительной системы человека. — Одесса: Астропринт. — 2003. — С.228–268.
4. **Дорохова А. Э.** Супероксидный анион и супероксид дисмутаза сетчатки при интоксикации дитизоном // Матер. наук-практ. конф. офтальмол. з міжнародн. участю «Філатовські читання», присвяч. 75-річчю заснування Інституту ім. В. П. Філатова. 26–27 травня 2011 р. Одеса. — 2011. — С. 323–324.
5. **Мальцев Э. В., Дорохова А. Э.** Диабетическая ретинопатия при дитизиновой модели сахарного диабета // Матер. міжнародн. наук. конф. присвяч. 100-річчю з дня народження акад. Н. О. Пучківської «Сучасні аспекти клініки, діагностики та лікування очних хвороб», 29–30 травня 2008р. — Одеса, 2008 р. — С. 323–324.
6. **Мальцев Э. В.** Состояние сетчатой и сосудистой оболочки глаза кролика с сахарным диабетом, моделирован-

- ным дитизином. Сообщение 1. Структурные изменения / Э. В. Мальцев, А. В. Зборовская, А. Э. Дорохова // Офтальмол. журн. — 2011. — № 6. — С. 20–27.
7. **Мальцев Э. В., Зборовская А. В., Дорохова А. Э.** Состояние сетчатой и сосудистой оболочек глаза кролика с сахарным диабетом, моделированным дитизином. Сообщение 2. Антиоксидантные ферменты и супероксидный кислород // Офтальмол. журн. — 2012. — № 3. — С. 61–67.
  8. **Мальцев Э. В., Зборовская А. В., Дорохова А. Э.** Нейродегенерация и нейропротекция при диабетической ретинопатии // Офтальмол. журн. — 2012. — № 1. — С. 67–72.
  9. Нарушения углеводного обмена. Сахарный диабет. В кн.: Руководство по медицине. — The Merck manual: М., Мир, 1997. — Т. 1. — С. 751–765.
  10. Принципы и методы гисто-цитохимического анализа в патологии / Под ред. Авцына А. П., Струкова А. И., Фукса Б. Б. — Л., «Медицина», Ленинградское отд., 1971. — 368 с.
  11. **Шуколюков С. А.** Электрофоретическое изучение белков наружных сегментов фоторецепторов сетчатки после солюбилизации в системе додецилсульфат-меркаптоэтанол-мочевина // Укр. біохім. журн. — 1973. — № 1. — С. 55–60.
  12. **Юрова О. В., Турова Е. А., Морозова Н. Е.** и др. Эффективность нейропротекторной терапии в восстановительном лечении непролиферативной диабетической ретинопатии // Офтальмология. — 2011. — Т. 8, № 4. — С. 51–56.
  13. **Bhutto I. A., Kim S. U., McLeod D. S.** et al. Localization of collagen XVIII and the endostatin portion of collagen XVIII in aged human control eyes and eyes with age-related macular degeneration // Invest. Ophthalmol. Vis Sci. — 2004. — Vol. 45, № 5. — P. 1544–1552.
  14. **Hansson H. A., Sourander P.** A lipid histochemical study of the rat retina damaged by visible light // Exp. Eye Res. — 1970. — Vol. 10, № 1. — P. 64–66.
  15. **Muller-Jensen K.** 1965. Histochemischer Nachweis saurer Mucopolysaccharide in der Sehzellschicht der Säugetierretina // A. von Graefes Arch. klin. exp. Ophthalmol. — 1965. — Bd. 168, № 6. — S. 572–576.
  16. **Rabinovitch M., Mota I., Vonedá S.** Note on the histochemical localization of glycogen and pentosepolynucleotides in the visual cells of the chick (*Gallus gallus*) // J. Cell Science. — 1954. — Vol. 3. — P. 5–9.
  17. **Robinson W. G., Nagata M., Laver N.** et al. Diabetic-like retinopathy in rats prevented with an aldose reductase inhibitor // Invest Ophthalmol. Vis. Sci. — 1989. — Vol. 30, № 11. — P. 2285–2292.
  18. **Robinson W. G., Mc Caleb M. L., Feld L., Michaelis O.** et al. Degenerated intramural pericytes (ghost cells) in the retinal capillaries of diabetic rats // Current Eye Res. — 1991. — Vol. 10, № 4. — P. 339–350.
  19. The rabbit in eye research. — Ed by **J. H. Prince** ch. C. Thomas-publisher, Springfield, Illinois, USA. — 1964. — 652 p.
  20. **Tsuji N., Matsuura T., Ozaki K.** et al. Diabetic retinopathy and choroidal angiopathy in diabetic rats (WBN/Kob) // Exp. animals. — 2009. — Vol. 58, № 5. — P. 481–487.

Поступила 16.05.2012

Рецензент д. м. н., проф. В. В. Вит

THE STATE OF THE RETINAL AND VASCULAR MEMBRANES OF THE RABBIT EYE WITH DIABETES MELLITUS MODELED BY DITHIZONE. REPORT 3. PAS-POSITIVE MATERIAL.

Maltsev E. V., Zborovskaya A. V., Dorokhova A. E.

Odessa, Ukraine

It has been demonstrated on dithizone model of the rabbits with diabetic retinopathy that neurodegenerative changes of this almost avascular retina are manifested in the nuclear layers, in ganglionic cell layer and were accompanied by marked changes in other retinal layers. At the same time the PAS-reaction intensity of this object diminished and mode of its deposits was changed. Such facts point out the metabolic defects of different retinal carbohydrate compounds.

