

УДК 617.735:616.379-008.64-092.4:615.361.013.85.014.41

Ю. А. Демин, М. Ю. Демина  
Харьковская медицинская академия последипломного образования, г. Харьков

## ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЕТЧАТКИ КРЫС ПРИ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПЛАЦЕНТЫ

В эксперименте на модели стрептозотоцининдуцированного сахарного диабета 2 типа изучена морфология сетчатки после использования криоконсервированных мезенхимальных стволовых клеток плаценты. Доказана терапевтическая эффективность препарата криоконсервированных мезенхимальных стволовых клеток плаценты, которая выражалась снижением отека и уменьшением деструктивных и апоптических проявлений в сетчатке.

**Ключевые слова:** стрептозотоциновый сахарный диабет, сетчатка, криоконсервированные мезенхимальные стволовые клетки.

Лидирующее место среди заболеваний глаз приводящих к слепоте занимает диабетическая ретинопатия (ДР). Диабетическая ретинопатия развивается у 97% больных с инсулинзависимым сахарным диабетом и у 60% – с инсулиннезависимым сахарным диабетом [5]. Изучение этиопатогенеза, а также разработка методов лечения ДР является одной из актуальных проблем современной офтальмологии. В последнее десятилетие интенсивно развивается новое направление медицины – клеточная и тканевая терапия, суть которой заключается в использовании криоконсервированных клеток и тканей эмбриофетоплацентарного комплекса с целью активации компенсаторных ресурсов поврежденных тканей в организме реципиента, а также стимуляции механизмов регенерации, замещения клеточных и тканевых структур при дальнейшем восстановлении функции организма [1].

**Целью** работы было изучение патоморфологических изменений в сетчатке крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом 2 типа после интравитреального и внутривенного введения криоконсервированных мезенхимальных стволовых клеток плаценты (кМСКП).

**Материал и методы исследования.** Исследования проводили на модели СД 2 типа на половозрелых самцах лабораторных крыс линии Вистар исходной массой 130-160г. Крысы содержались в стандартных условиях вивария при 12-часовом дневном освещении, температуре воздуха 20-25 оС, влажности воздуха – 50-55%. Инсулинорезистентность моделировали у крыс в течение десяти недель с помощью высококалорийной (высокожировой и высокоуглеводной) диеты, которая состояла из 15% жира, 25% сахарозы, 1% желчных кислот та 59,0 % стандартного питания, рекомендованного для данного вида животных. Интактные животные в течение десяти недель получали стандартную диету вивария.

Через четыре недели после начала эксперимента крысам, получавшим высококалорийную диету, внутрибрюшинно вводили цитратный раствор стрептозотоцина в дозе 25 мг/кг массы тела один раз в неделю в течение двух недель. Контрольные животные по аналогичной схеме получали внутрибрюшинно цитратный буфер [6]. Таким образом, данная модель позволяет воспроизвести два ключевых патогенетических механизма, наблюдаемые у больных сахарным диабетом 2 типа, а именно - нарушение секреции и действия инсулина.

Через семь дней после последней инъекции стрептозотоцина всех экспериментальных животных разделили на группы: интактный контроль (Н+кМСКП), крысы с диабетом, получавшие кМСКП (Д+кМСКП) и крысы с диабетом получавшие плацебо (Д+плацебо). кМСКП вводили внутривенно в концентрации  $1,1 \times 10^6$  и интравитреально (для последующего изучения ретинопатии) в концентрации  $0,1 \times 10^6$  контрольным животным и крысам с СД 2 типа, индуцированным высококалорийной диетой и стрептозотоцином. Крысы группы Д+плацебо получали плацебо соответствующего объема по аналогичной схеме.

Фоторегистрацию проводили цифровой камерой Sigeta Ucmos 3100. Морфометрию проводили при помощи программы Topr Tek View 3.7.939. Статистическую обработку полученных данных выполняли при помощи программы Statgraph 2.0, используя непараметрический критерий Уитни-Манна.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Сетчатка крыс в норме представлена десятью четко выраженными слоями, которые имеют разную толщину в центральном и периферическом ее участках.

Следует отметить неравномерность толщины ее наружного ядерного слоя у контрольных и у больных диабетом крыс, что придает ему некоторую волнистость именно с наружной стороны, т.е. обращенной к фоторецепторам, что хорошо заметно на рис 1. В слое ганглиозных нервных клеток обращает на себя внимание как наличие клеток разного размера, так и неодинаковая плотность их расположения в различных участках сетчатки. Эти признаки характерны для нормальной сетчатой оболочки крысы полностью сохраняются и при СД 2 типа.

Патологические изменения в морфологических структурах сетчатой оболочки могут быть учтены либо путем морфометрических подсчетов клеточных элементов и иных структур, либо после использования других специальных методик, скажем, идентификации апоптозирующих клеток. Такие исследования в последнем десятилетии были проведены несколькими группами зарубежных авторов, которые сообщили о возрастании количества апоптозирующихся нейронов и нейроглиальных клеток, утрате части ганглиозных нейронов, шестнадцатипроцентном истончении внутреннего сетчатого слоя в сетчатке крыс, получивших стрептозотоцин [2, 3, 4]. После воспроизведения стрептозотоцинового диабета у таких животных имеет место и некоторое истончение наружного ядерного слоя этой оболочки опять же вследствие апоптозирования его клеток [7].

В контрольной группе крыс и группе Н+кМСКП сетчатка глаз не изменена, обычного строения и толщины. В ганглиозном слое содержащем ганглиозные нервные клетки ядра с умеренным количеством гетерохроматина. Биполярные клетки и клетки Мюллера внутреннего ядерного слоя с ядрами умеренной оптической плотности (рис.2).

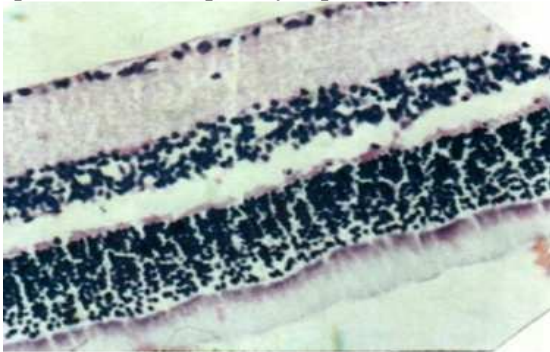


Рис.1. Нормальное строение сетчатки крыс Вистар. (x400, окраска гематоксилин –эозином).

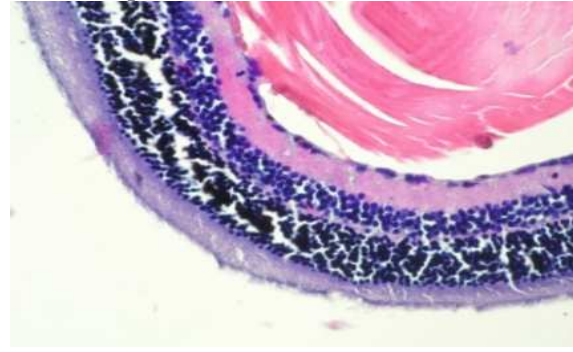


Рис 2. Сетчатка глаза самца крысы группы Н+кМСКП. (x400, окр. гематоксилин –эозином).

В группе Д+кМСКП в сетчатках крыс наблюдается отек внутреннего сплетениевидного слоя (рис.4), о чем может свидетельствовать незначительное увеличение его толщины (рис 3).

Одной из причин отека сплетениевидного слоя может быть уменьшение насыщенности клеток сетчатки кислородом. Подтверждением нарушения снабжения сетчатки кислородом являются данные морфометрии показывающие значительное меньшее количество капилляров заполненных эритроцитами в группе Д+кМСКП. Незначительное утолщение внешнего (наружного) ядерного слоя с сегментами фоторецепторов может быть связано с пролиферацией рецепторных клеток, возможно вызванной стволовыми клетками, введенными в полость глаза.

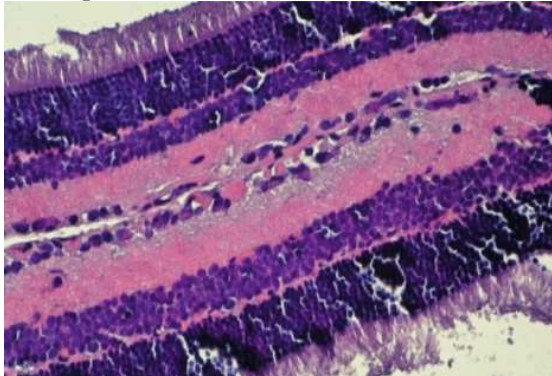


Рис. 4. Сетчатка глаза самца крысы группы Д+кМСКП. (x400, окраска гематоксилин –эозином).

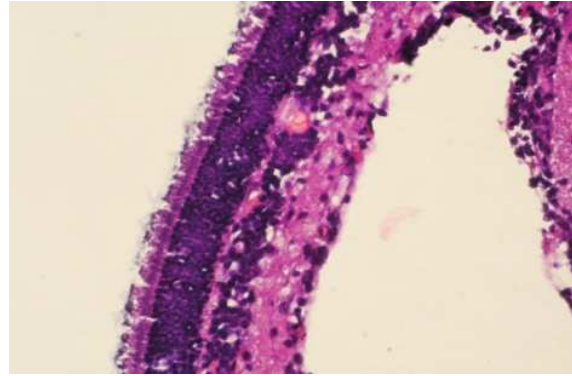


Рис. 6 Сетчатка глаза самца крысы группы Д+пlaceбо. (x400, окраска гематоксилин –эозином).

Толщина сетчатки в этой группе меньше, чем в группе Н+кМСКП (рис. 5).

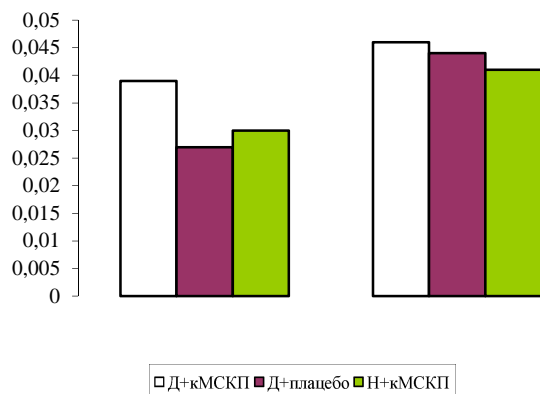


Рис. 3. Толщина слоёв внутреннего сплетеневидного и внешнего ядерного с сегментами фоторецепторов.

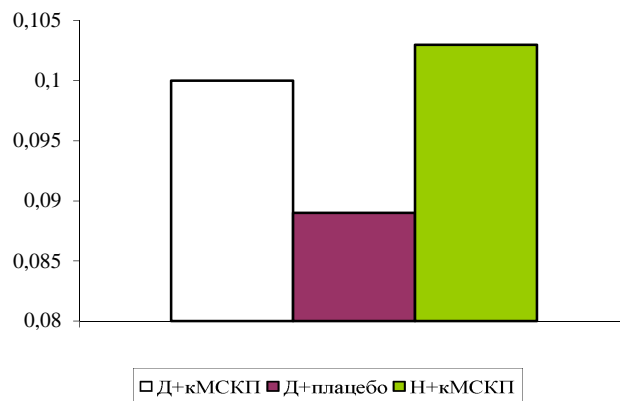


Рис.5. Толщина сетчатки.

Одной из причин незначительного уменьшения толщины сетчатки в группе Д+кМСКП возможно связана с атрофией внутреннего ядерного слоя (рис.4), что может быть вызвано недостатком трофики сетчатки. Также, при стрептозотоциновом диабете в ганглиозных нервных клетках, в клетках внутреннего (биполярные клетки и клетки Мюллера) и наружного ядерного (палочки и колбочки) слоев усиливается гетерохроматизация ядер, что свидетельствует о конденсации хроматина, что является предвестником и ранним проявлением апоптоза.

Таким образом, в группе Д+кМСКП развивается отек внутреннего сплетениевидного слоя, атрофия внутреннего ядерного слоя, что вызвано стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом. При введении кМСКП наблюдается утолщение внешнего (наружного) ядерного слоя с сегментами фоторецепторов возможно обусловлено стимулирующим пролиферацию воздействием стволовых клеток.

Для уточнения влияния трансплантации клеток на восстановление повреждений сетчатки, вызванных стрептозотоцин индуцированным диабетом, необходимо провести дополнительное гистологическое исследование на животных, которым не проводилось лечение (Д+плацебо).

В группе Д+ плацебо гистологическая оценка показывает явления отека во внутреннем сплетениевидном слое (рис. б), хотя его толщина меньше чем в первых двух группах (рис. 3), а также увеличение толщины внешнего ядерного слоя с сегментами фоторецепторов (рис. 3)(рис. 5). При этом толщина сетчатки данного образца значительно меньше (рис. 5). Также отмечена умеренная гетерохромность ядер ганглиозных нервных клеток, клеток внутреннего (биполярные клетки и клетки Мюллера) и наружного ядерного (палочек и колбочек) слоев. Кроме того, данные морфометрии свидетельствуют о меньшем количестве капилляров содержащих эритроциты в сравнении с группой Д+кМСКП.

Межклеточное пространство внутреннего и внешнего ядерных слоёв иногда незначительно расширено, наблюдается плазморагия и геморагия в капиллярах внутреннего ядерного и внутреннего сплетениевидного слоев (рис.б).

В группе крыс с сахарным диабетом наблюдается истончение сетчатки. После лечения СД 2 типа с помощью кМСКП наблюдается утолщение сетчатки.

В группе крыс, страдающих СД, наблюдается резкое снижение количества ганглиозных клеток, а после интравитреального введения кМСКП наблюдается увеличение количества ганглиозных клеток по сравнению с группой крыс больных СД, что свидетельствует о нейропротекторном действии на сетчатку.

### Выводы

1. Морфологическими признаками ранней нейродегенерации сетчатки при ДР являются: снижение количества и апоптозирование ганглиозных клеток, истончение внутреннего сетчатого слоя, апоптоз нейронов внутреннего ядерного слоя, истончение сетчатки в целом, усиление гетерохроматизации ядер, конденсация хроматина.
2. Внутривенное и интравитреальное введение кМСКП позволяет нормализовать морфологическую структуру сетчатой оболочки крыс со стрептозотоциновым СД 2 типа.

*Перспективы дальнейших исследований.* Экспериментальное обоснование применения кМСКП в лечении стрептозотоцинового диабета 2 типа открывает перспективное направление в клиническом использовании кМСКП при ДР.

**Список літератури**

1. Грищенко В. І. Клітинна і тканинна терапія: сучасне і майбутнє / В. І. Грищенко // Трансплантологія.- 2000.-Т. 1, №1.- С.15-17.
2. Aizu Y. Degeneration of retinal neuronal processes and pigment epithelium in the early stage of the streptozotocine-diabetic rats / Y. Aizu, K. Oyanagi, J. Hu [et al.] // Neuropathology.-2002.-Vol.22-P.161-170.
3. Barber A. J. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes / A. J. Barber, E. Leith, S. A. Khin [et al.] // J.Chin. Invest.-1998.-Vol.102, №4.-P.783-791.
4. Barber A. J. Ins 2 Akita mouse as a model of ewly retinal complicatins in diabetes / A. J. Barber, D. A. Antonetti, T. S. Kern [et al.] // Invest Ophthalmol. Vis. Sci.- 2005.-Vol.46.- P.2210-2218.
5. Gogina I. Changes of Microcirculation and Energy Metabolism in Diabetic Angiopathy / I. Gogina, E. Pleshanov, V. Covalyshyn [et al.] // Acta Medica Austriaca. – 1992. – № 19. –90 p.
6. IDF Diabetes Atlas / International Diabetes Federation.–6th, ed.– Brussels, Belgium - 2013.– 160 p.
7. Park S. H. Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina / S. H. Park, J. W. Park, S. J. Park [et al.] // Diabetologia.-2003.- Vol.46.- P.1260-1268.

**Реферати**

**ПАТОМОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ СІТКІВКИ ЩУРІВ ПРИ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМУ ДІАБЕТИ 2 ТИПУ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ПЛАЦЕНТИ**

**Дьомін Ю.А., Дьоміна М. Ю.**

В експерименті на моделі стрептозотокцин індукований цукрового діабету 2 типу вивчена морфологія сітківки після використання кріоконсервованих мезенхімальних стовбурових клітин плаценти. Доведена терапевтична ефективність препарату кріоконсервованих мезенхімальних стовбурових клітин плаценти, яка виражалася зниженням набряку і зменшенням деструктивних і апоптичних проявів в сітківці.

**Ключові слова:** стрептозотокциновий цукровий діабет, сітківка, кріоконсервовані мезенхімальні стовбурові клітини.

Стаття надійшла 2.09.2015 р.

**PATOMORFOLOGICAL CHANGES OF RAT'S RETINA IN TYPE 2 STREPTOZOTOCIN DIABETI AFTER INTRODUCTION OF CRYOPRESERVED MESENCHYMAL STEM CELLS OF PLACENTA**

**Domin Yu. A., Domina M. Yu.**

In the experiment on the model of streptozotocin-induced type 2 diabetes studied the morphology of the retina after the use of cryopreserved mesenchymal stem cells of the placenta. Tereapevicheskaya prove the efficacy of cryopreserved placental mesenchymal stem cells, which expressed decrease swelling and decrease of apoptotic and destructive manifestations in the retina.

**Key words:** streptozotocin diabetes, the retina, cryopreserved mesenchymal stem cells.

Рецензент Шепітько В.І.

УДК 611.42-018-018.1:615.218.1

**О. В. Дулок, О. Д. Лушк**

**Львівський національний медичний університет ім. Д. Галицького, м. Львів**

**ГІСТО- ТА ЦИТОАРХІТЕКТОНІКА СЕЛЕЗІНКИ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ АНТИГІСТАМІННИХ ПРЕПАРАТІВ**

Метою роботи було вивчити у експерименті стан мікроструктури селезінки на тлі застосування антигістамінного препарату Лоратадину. Встановлено, що 10-ти та 30-ти денне його пероральне введення білим щурам веде до порушення гісто- та цитоархітектоніки селезінки. Спочатку отримані зміни проявлялися декомплексацією компонентів червоної пульпи у вигляді розширення та повнокрів'я венозних синусів, наростання вмісту еритроцитів у ретикулярній стромі. На 30-й день досліду поруч з попередніми з'явилися зміни у білій пульпі. Вони супроводжувалися збільшенням вмісту локальних та дифузних скупчень лімфоїдних елементів, появою поодиноких фолікулів з добре помітними гермінативними центрами. Проте, ознак глибокої деструкції помічено не було. Отже, отримані зміни не дають підстав стверджувати про розвиток суттєвих зрушень у структурно-функціональному стані селезінки у вказані терміни.

**Ключові слова:** селезінка щура, біла пульпа, червона пульпа, Лоратадин.

*Робота є фрагментом НДР "Лектино- та імуногістохімічний аналіз вуглеводних детермінант нормальних та патологічно змінених клітин і тканин", № 0113U000207.*

На сьогоднішній день відомо, що ксенобіотики, до яких відносять і хіміопрепарати володіють поруч із терапевтичним ефектом багатовекторним впливом на структурно-функціональний стан багатьох органів та їх систем. При цьому цей вплив відчувають і органи імунного захисту, що проявляється змінами імунологічної реактивності організму [5].

Сучасний фармацевтичний ринок налічує понад 55 тис. сполук-ліків які за певних умов можуть бути небезпечними для людини [8]. Останніми роками почастишали випадки медикаментозних отруєнь різними препаратами, серед яких фігурують і антигістамінні. Однією із причин цього є "популярність" таких препаратів при самолікуванні різного роду алергій, "зазудних" захворювань [2]. Останнім часом антигістамінні препарати у комплексі з центральними холіноблокаторами та етанолом використовують також соціально-дезадаптовані