

ИЗУЧЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА АНТИОКСИДАНТОВ У ЖИВОТНЫХ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИЕЙ НА ОСНОВАНИИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Малова Н. Г., Демин Ю. А., Лекишвили С. Е., Литвинова Л. В.

ХМАПО, ГУ «Институту проблем эндокринной патологии

им. В. Я. Данилевского АМН Украины

Изучено состояние сосудов сетчатки в условиях моделированного диабета путем введения крысам стрептозотоцина и после применения комплекса антиоксидантов «таурин+витамин С». На основании морфологических исследований показано, что сочетанное влияние антиоксидантов оказывает более выраженный терапевтический эффект, снижает выраженность деструктивных проявлений в сосудах сетчатки при диабетической ретинопатии.

Ключевые слова: сахарный диабет, ретинопатия, сосуды сетчатки, эндотелиальные клетки, антиоксиданты.

Диабетическая ретинопатия (ДРП), развивающаяся у пациентов с сахарным диабетом первого и второго типа является основной причиной инвалидизации среди лиц трудоспособного возраста [2]. Структурными проявлениями ДРП является утолщение базальной мембраны капилляров, утрата перicyтов, формирование микроаневризм, повышение сосудистой проницаемости, нарушением осморегуляции, отложение экссудата и закупорка капилляров сетчатки [3]. Указанные микрососудистые изменения могут привести к образованию неперфузированных областей и значительных ишемических поражений сетчатки, что способствует ухудшению зрения.

В настоящее время проводятся активные поиски новых фармакологических средств, комплексно нормализующих метаболический гомеостаз организма [4]. Данная проблема требует разработки терапевтической стратегии, направленной на блокирование основных патогенетических процессов в развитии микроангиопатий.

Перспективным является применение комплекса антиоксидантов. Особого внимания заслуживают исследования терапевтического влияния таурина – полунезаменимой аминокислоты человека, которая имеет важное значение для развития и нормального функционирования сетчатки [5]. Известно, что таурин регулирует концентрацию кальция, осмотическое давление, имеет защитные (антиоксидантные), иммуномодулирующие, сигнальные и мембраностабилизирующие функции в клетках сетчатки и хрусталике глаза [6]. Он также необходим для нормального функционирования и развития организма [7]. Единичные экспериментальные дан-

ные, проведенные за последние годы подтверждают возможность эффективного использования таурина с целью снижения риска диабетических осложнений, в том числе и ДРП [8].

Цель данного исследования – изучение влияния комплекса антиоксидантов на гистоструктуру тканей глаза у животных с диабетическими микроангиопатиями на основании световой и электронной микроскопии.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 30 половозрелых крысах – самцах линии Вистар массой 180–200 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария при соответствующем освещении и стандартном питании, при свободном доступе к питьевой воде. Исследования проводили в соответствии с «Общепринятыми этическими принципами экспериментов на животных» (Украина, 2000), которые соответствуют положениям «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, которые используют для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург 1985).

Высокодозированный стрептозотоциновый диабет моделировали путем однократного внутривентрикулярного введения стрептозотоцина («Sigma», США) в дозе 70 мг/кг половозрелым крысам-самцам линии Вистар. Под влиянием стрептозотоцина у крыс развивается острый некроз бета-клеток и выход из них инсулина, устойчивая гипергликемия наблюдается через 24–72 часа и сохраняется продолжительное время.

После моделирования диабета крысы прини-

мали ежедневно перорально на протяжении шести недель комплекс природных антиоксидантов – таурин (300 мг/ кг массы тела) и витамин С (200 мг/кг массы тела) и плацебо.

Для гистологических исследований глаза крыс фиксировали в растворе с массовой долей нейтрального формалина 10%. Обезжизнение проводили в спиртах с возрастающей крепостью (в 70° спирте и два раза в 96°) далее в растворе спирт – эфир (раствор 1:1). Затем образцы помещали в целоидин.

Гистологические срезы толщиной 7–10 мкм изготавливали на санном микротоме Reichert. Полученные срезы окрашивали гематоксилином эозином, а также по Ван-Гизон [10].

Исследование полученных гистологических препаратов и их фотографирование проводили на световом микроскопе «AxioStar Plus».

Для электронномикроскопических исследований участков сетчатки глаза проводили фиксацию согласно рекомендаций Б. Уикли [11, 2] в растворе с массовой долей глутаральдегида 4% в фосфатном буфере. Затем дофиксировали в растворе с массовой долей OsO₄ 1% (фиксатором Колфилда), обезжизняли в спиртах нарастающей крепости и ацетоне, далее помещали в епон-аралдит.

Полутонкие (1–2 мкм) и ультратонкие срезы (30–40 нм) изготавливали на ультрамикротоме УМПТ-ЗМ. Полутонкие срезы окрашивали метиленовым синим и основным фуксином [12, 3], а ультратонкие – контрастировали по Рейнольдсу [13, 4]. Оценку материала проводили на электронном микроскопе ЕМВ-100БР.

Результаты исследований

В сетчатке животных контрольной группы присутствуют сосуды различного калибра, имеющие хорошо сформированную эндотелиальную стенку, представленную эндотелием непрерывного типа. Он неравномерный на протяжении, содержит очаги разряжения, эпителиоциты имеют плотные пикнотичные ядра. В сосудистом слое нарушена проницаемость капилляров, имеет место разрыхление оболочки сосудов, эндотелиальные клетки с признаками апоптоза, лизиса или карнопикноза (рис. 1).

Электронномикроскопический анализ показал, что для данной серии эксперимента характерным является наличие кровеносных сосудов с выраженной патологией эндотелиального слоя. При этом эндотелиальный слой становится прерывистым – между отдельными эндотелиоцитами формируются пространства, заполненные тонковолокнистым межклеточным веществом подлежащей соединительной ткани из субэндотелиального слоя. При этом эндотелиальные клетки имеют значительно меньшие размеры, по сравнению с таковыми контрольной группы,

отсутствует четкость контуров цитоплазматической мембраны, цитоплазма имеет бесструктурный вид, то есть в ней отсутствуют мембранные органеллы (рис. 2, 3).

Следует отметить, что эндотелиальные клетки располагаются на близком расстоянии друг от друга, главным образом за счет «компактизации» цитоплазмы и уменьшения протяженности ее периферической зоны, непосредственно принимающей участие в трансэндотелиальном переносе веществ. Ядра эндотелиоцитов имеют нетипичную «уродливую» фестончатую форму с множеством лопастей и инвагинаций (рис. 2, 3). В таких ядрах увеличен удельный вес гетерохроматина по сравнению с эухроматином. На преобладающей территории ядра ядерная мембрана не контурируется.

В средней оболочке сосудов, представленной главным образом, гладкомышечными клетками, отмечено значительное увеличение количества и размеров плотных телец (рис. 3), что по всей видимости, отражает активизацию процессов кальцификации в этих клетках, протекающую на фоне деструктивных процессов.

В наружном соединительнотканном слое сосудов (адвентиции) встречаются собственные сосуды и гемокапилляры с патологией эндотелия, характеризующиеся сужением эндотелиальной выстилки, вплоть до ее полного отсутствия (рис. 4).

Участки без эндотелиального слоя. Карнопикноз. Большое количество плотных телец. Контрастирование по Рейнольдсу. х5700

Значительная часть гемокапилляров запустевшая и не содержит форменных элементов крови. В гладкомышечных клетках увеличено содержание электронноплотных телец.

Полученные данные свидетельствуют о том, что у животных воспроизведена модель первой стадии диабетической ретинопатии (фоновая непролиферативная ретинопатия).

Нами также проведен электронномикроскопический анализ состояния сосудов после применения комплекса «таурин+витамин С». В результате проведенных исследований установлено частичное восстановление эндотелиального слоя пораженных сосудов. Так, значительная часть сосудов имела характерную для контрольной группы эндотелиальную выстилку. Сами эндотелиоциты были преимущественно крупных размеров с большими овально-удлиненными или округлыми ядрами, в которых преобладал эухроматин (рис. 5). Гетерохроматин был конденсирован в виде узкой каймы по внутренней поверхности ядерной мембраны, а также диспергирован в виде небольших глыбок по всей территории ядра.

В цитоплазме таких эндотелиоцитов присутствовала развитая гранулярная ЭПС в виде канальцев и отдельных цистерн с рибосомами на их

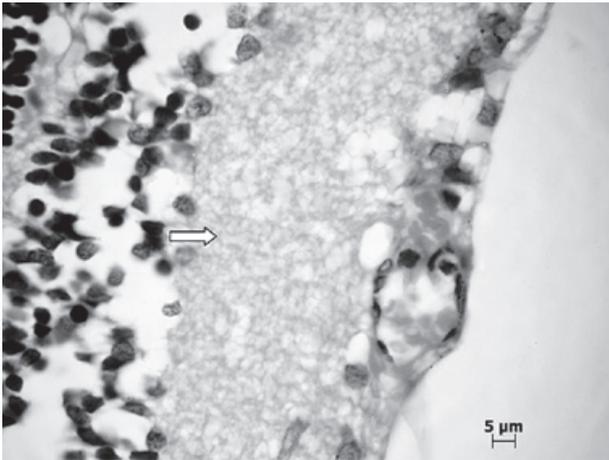


Рис. 1. Нарушение организации сосудистой оболочки. Апоптоз пикноз и набухание эндотелиальных клеток. Нарушение проницаемости. Очаг кровоизлияния. Моделирование диабета. Гематоксилин и эозин

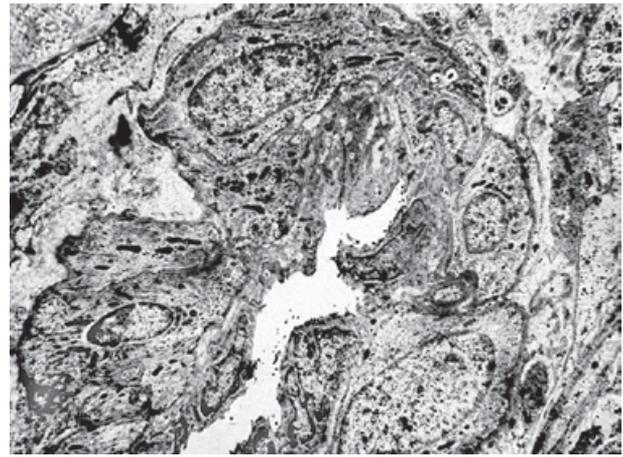


Рис. 2. Просвет сосуда (артерии). Компактное расположение эндотелиоцитов. Периферическая зона эндотелиоцитов редуцирована. Кальцификация цитоплазмы гладкомышечных клеток. Контрастирование по Рейнольде, x5400

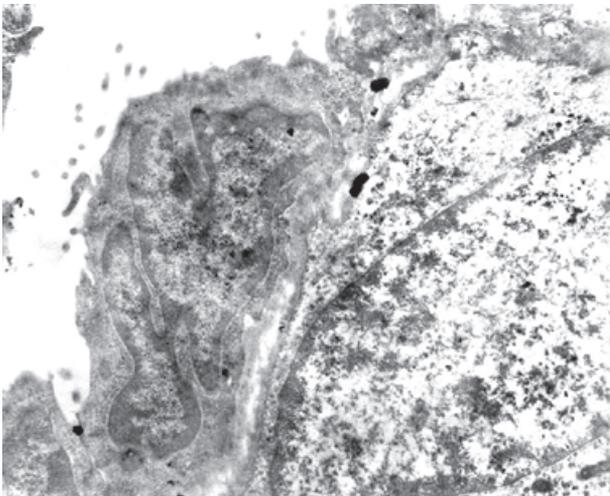


Рис. 3. Лопастное ядро эндотелиоцита. Гомогенная цитоплазма. Контрастирование по Рейнольде, x 15700

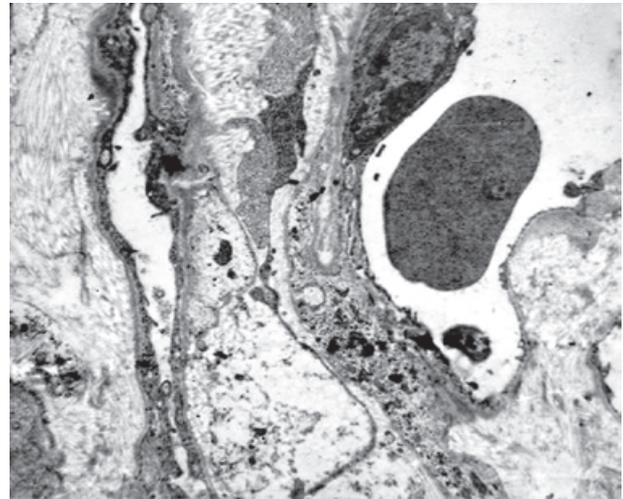


Рис. 4. Резкая суженность эндотелиального слоя сосуда адвентиции

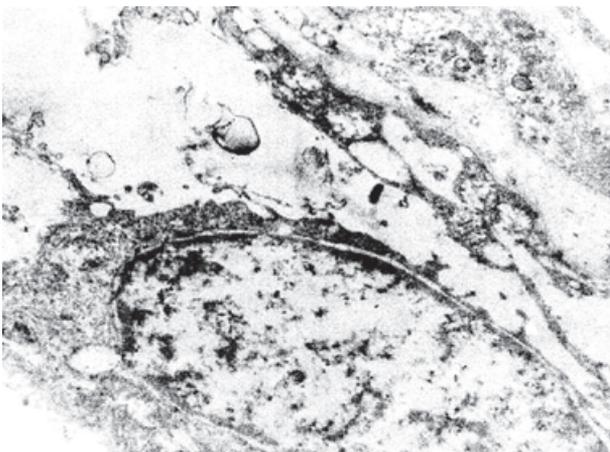


Рис. 5. Эндотелиоцит с крупным эухромным ядром, формирующий



Рис. 6. Просвет сосуда с тонкой эндотелиальной выстилкой. Малодифференцированная клетка с крупным ядром и узкой каймой цитоплазмы. Лечение животных комплексом «таурин+витамин С». Контрастировано по Рейнольде, x8500

поверхности. В цистернах эндоплазматической сети определялись транспортные везикулы, что свидетельствует об участии этих клеток в транс-эндотелиальном переносе веществ. В эндотелиоцитах хорошо определялась периферическая зона, хотя она и была сужена по сравнению с таковой контрольной группы. В субэндотелиальном слое сосудов присутствовали малодифференцированные соединительнотканые клетки округлой или звездчатой формы с крупным слегка фестончатым ядром и узкой каймой цитоплазмы (рис. 6).

Полученные данные свидетельствуют об эффективности использования комплекса «таурин+витамин С» в нормализации патоморфологической структуры сосудов сетчатой оболочки у экспериментальных животных с сахарным диабетом.

Выводы

1. Изучено состояние сосудов сетчатки при моделировании сахарного диабета у крыс. Полученные результаты морфологических исследований

подтверждают моделирование диабетической непролиферативной ретинопатии, Установлено, что нарушение целостности эндотелиального слоя сосудов сопровождается «компактизацией» цитоплазмы эндотелиоцитов за счет уменьшения протяженности ее периферической зоны, принимающей участие в трансэндотелиальном переносе веществ. Эндотелиальные клетки имеют значительно меньшие размеры, по сравнению с таковыми контрольной группы, отсутствует четкость контуров цитоплазматической мембраны и имеет место разрушение мембранных органелл. Нарушена форма ядер эндотелиоцитов. Между отдельными эндотелиоцитами формируются пространства, заполненные тонковолокнистой соединительной тканью. В просвете сосудов определяется скопление клеточного детрита.

2. Применение витамина С в сочетании с таурином у крыс при ДРП снижает выраженность деструктивных проявлений в сосудах сетчатки, что способствует стабильному течению диабетической ретинопатии, а также снижает количество осложнений.

Литература

1. Тронько М. Д., Єфімов А. С., Кравченко В. Л., Паньків В. Л. Епідеміологія цукрового діабету. – К. 2000. – 152 с. I. Advanced glycation end products and receptor-oxidative stress system in diabetic vascular complications. [Text] / S. Yamagishi // Ther. Apher. Dial. – 2009. – № 13. – P. 534–539.
2. Glucose-induced endothelin-1 expression is regulated by ERK5 in the endothelial cells and retina of diabetic rats. [Text] / Y. Wu, B. Feng, S. Chen, et al. // J Physiol Pharmacol. – 2010. – Vol. 88. – № 6. – P. 607–615.
3. Prevalens, incidence and mortality of type 2 diabetes mellitus revisited: a prospective population-based study in the Netherlands (ZODIAC-1). / Ubink-Veltman LJ, Bilo HJ, Groenier KH et al. // Eur J Epidemiol. – 2003. – Vol. 18. – № 8. – P. 793–800.
4. Taurine stimulation of calcium uptake in the retina: mechanism of action / Militante JD, Lombardini JB. // Exp Med Biol. – 2003. – Vol. 54. – P. 526–547.
5. Implication of nitric oxide in the increased islet-cells vulnerability of adult progeny from protein-restricted mothers and its prevention by taurine. / Goosse K, Bouckenooghe T, Balteau M, Reusens B, Remade C. // Endocrinol. – 2009. – Vol. 200. – № 2. – P. 177–87.
6. Is taurine a functional nutrient? / Bouckenooghe T, Remade C, Reusens B. Bouckenooghe T, Remade C, Reusens B. // Clin Nutr Metab Care. – 2006. – Vol. 6. – № 9. P. 728–33.
7. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах [Текст] / Під ред. О.Г. Резнікова // Ендокринологія. – 2003. – Т. 8, № 1. – С. 142–145. Э.
8. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin
9. M. Eisner, B. Gulbakke, M. Tiedge [et al.] // Diabetologia. – 2000. – Vol. 43, № 12. – P. 1528–1533.
10. Bennett, R. Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin [Text] / R. Bennett, A. Pegg // Cancer. Res. – 1981. – Vol. 41, № 12. – P. 2786–2790.

ТHERAPEUTIC EFFICIENCY OF COMPLEX ANTIOXIDANTS AT ANIMALS WITH THE EXPERIMENTAL DIABETIC RETINOPATHY ON THE BASIS OF MORPHOLOGICAL RESEARCHES

Demin J. A., Litvinova L. V., Malova N. G., Lekishvili S. E.

The Kharkov medical academy after degree education

The Publish establishment «The Institute of Problems Endocrine Pathology named after V. Ya. Danilevsky. AMS. Ukraine»

The condition of vessels of a retina in conditions incidence a diabetes by introduction to rats streptozotocin and after complex application antioxidants