

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

Государственное учреждение "Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова  
НАМН Украины", 65044, Одесса

## СОСТОЯНИЕ СЕТЧАТОЙ И СОСУДИСТОЙ ОБОЛОЧЕК ГЛАЗА КРОЛИКА С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ, МОДЕЛИРОВАННЫМ ДИТИЗОНОМ: ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ДИТИЗОНОВОЙ МОДЕЛИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ

(Представлено чл.-корр. НАМН Украины Н. В. Пасечниковой)

В связи с активным развитием нейродегенеративной теории патогенеза диабетической ретинопатии (ДР) возникла необходимость разработки ее моделей, при которых нейродегенеративные изменения структур сетчатки ярко выражены, развиваются быстро и легко фиксируются наблюдателем. Опыты проводили на кроликах с дитизиновым сахарным диабетом (СД), а также на крысах и мышах со стрептозотоциновым СД. На 16 неделе развития у кроликов дитизинового СД были определены грубые, легко детектируемые дегенеративные изменения нейроэпителия и пигментного эпителия сетчатки, сопровождающиеся снижением в ней содержания ШИК положительных веществ. У крыс и мышей побочные изменения отсутствовали. Использование дитизиновой модели СД целесообразно при проведении тестирования средств и способов, направленных на торможение нейродегенеративных проявлений ДР.

**Ключевые слова:** сахарный диабет, дитизон, диабетическая ретинопатия, нейродегенерация.

В начале текущего века было высказано мнение о том, что нейродегенерация имеет важное значение в патогенезе диабетической ретинопатии (ДР). Это явление имеет место на фоне общеизвестных микрососудистых повреждений сетчатки (либо даже предшествует им), которые являлись и являются основным объектом наблюдений на протяжении нескольких последних десятилетий. Настолько «основным», что и саму ДР до последнего времени рассматривают как одно из микрососудистых осложнений сахарного диабета (СД) [1, 3, 20, 47, 48]. Нет смысла приводить здесь многочисленные публикации, в которых описаны такие структурные, ультраструктурные, биохимические изменения микроциркуляторного русла сетчатки, хотя бы уже и потому, что ссылки на основные из них приведены

в наших уже опубликованных сообщениях на данную тему [8-13]. Упомянем лишь, что в этих работах установлено не только нарушение проницаемости стенок микрососудов, но и такие морфологические признаки их повреждения как утолщение базальных мембран, утрата эндотелиоцитов и перицитов, появление бесклеточных капилляров и прочее, отмеченные, в том числе, и в публикации сотрудников нашего учреждения [6].

Что же касается публикаций, в которых описаны проявления нейродегенеративных изменений сетчатки при СД у различных экспериментальных животных и человека (а также попытки применения некоторых препаратов для нейропротекторных воздействий на структуры такой сетчатки), появившихся в 2000-е годы, то им был посвящен

Э. В. Мальцев — гл.н.с. лаборатории патоморфологии и электронной микроскопии, д.м.н., профессор

*Отделение воспалительных заболеваний глаз и микрохирургического лечения их последствий*

А. В. Зборовская — зав. отделением, д.м.н.

А. Э. Дорохова — врач-офтальмолог, к.м.н. (dorochovaa@gmail.com)

© Э. В. Мальцев, А. В. Зборовская, А. Э. Дорохова, 2016.

обзор литературы, подготовленный с нашим участием и опубликованный в 2012 году [7]. Однако здесь совершенно необходимо подчеркнуть, что уже выдвинута гипотеза о том, что микрососудистые и нейродегенеративные нарушения могут иметь различные механизмы своего развития [25]. И вот именно это представляется нам сейчас особенно интересным. Здесь следует отметить, что усилиями многих исследователей была установлена роль нарушений полиольного и гексозаминного путей, гликирования, протеинкиназы-С в патогенезе ДР и доказано, что в их основании лежит ингибирование ключевого фермента гликолиза — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы супероксидным анион-радикалом [26, 28, 34, 37, 50]. Однако информации о метаболических основах именно нейродегенеративных изменений сетчатки при СД мало [7], хотя *a priori* можно предполагать, что здесь может оказаться немало общего с изменениями структур головного мозга при некоторых его патологических состояниях (например, болезни Альцгеймера). И неслучайно уже были предприняты попытки применения некоторых препаратов для нейропротективных воздействий на структуры сетчатки, о чем также шла речь в только что упомянутом обзоре.

Высокая степень обоснованности таких попыток становится особенно очевидной, если принять во внимание, что сегодня определение ДР как чисто «микрососудистого заболевания» признается неудовлетворительным. И в соответствии с рекомендацией от 2007 года Ассоциации по изучению зрения и офтальмологии (ARVO), принятой на летней конференции по исследованию глаза в США, ДР определяется как «структурные и функциональные изменения сетчатки, вызванные диабетом». И ее следует рассматривать как «сенсорную нейропатию, подобную автономной и периферической нейропатии, являющимися обычными признаками диабета и предиабета, включая нейропатию роговицы» [31]. Неудивительно поэтому, что нейродегенеративные изменения сетчатки являются наиболее ранним и стойким проявлением гипергликемии, предшествуя поражениям микрососудов, хориоидального кровообращения и атрофии эндотелия хориокапилляров [40, 46]. Учитывая сказанное, очевидна необходимость определения тех моделей ДР у животных, при которых нейродегенеративные изменения структур сетчатки наиболее ярко выражены, развиваются относительно быстро и легко фиксируются наблюдателем. С учетом вышесказанного, возможно и рассматривать в обобщенном виде основные результаты проведенной нами серии сравнительных морфологических, гистохимических и биохимических исследований сетчатой и сосудистой оболочек глаза при

некоторых моделях ДР, отдельные фрагменты которых уже были нами опубликованы [8-13].

**Материал и методы.** Опыты поставлены на 39 кроликах породы Шиншилла массой тела 2,5-3 кг, находившихся на обычном рационе питания. Для моделирования у них сахарного «цинкового» диабета средней степени тяжести использовали методику воспроизведения абсолютной инсулиновой недостаточности. Согласно ей, голодавшим в течение двух суток животным, под эфирным наркозом в ушную вену медленно вводили дитизон в истинной дозе из расчета 35 мг/кг массы тела. Через 6-7 часов (фаза гипогликемии), 33-36 часов (начало фазы вторичной стойкой гипергликемии) и 16-17 недель (развитой диабет) животных выводили из опыта путем воздушной эмболии после предварительного введения тиопентала натрия (50 мг/кг). Глаза энуклеировали и для светооптического исследования фиксировали в 10 % нейтральном формалине, а затем заливали гисторезином либо парафином. Изготовленные срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином либо использовали для проведения ШИК-реакции по методике Мак-Мануса — Хочкисса. Препараты просматривали и фотографировали под микроскопом «Laboval-4» (Carl Zeiss, Jena, ФРГ). Микрофотографирование препаратов производили цифровой фотокамерой «Canon PowerShot A480» (Япония).

Из глаз животных (18 кроликов), предназначенных для биохимических исследований, сразу же после энуклеации выделяли комплекс сетчатки с сосудистой оболочкой, который помещали в морозильную камеру при  $-55^{\circ}\text{C}$ . Были использованы 18 глаз животных через короткие сроки после введения им дитизона, а именно спустя 6-7 часов (стадия гипогликемии) и 33-36 часов (начальный период стадии вторичной стойкой гипергликемии). Извлеченный из глаза комплекс сосудистой и сетчатой оболочек растирали в фарфоровой ступке на льду, гомогенаты готовили на 0,05 М трис-НСl буфере рН 7,5 из расчета 20 мг/мл. Центрифугировали в центрифуге РФ-6 при 2500 об./мин в течение 20 минут и отбирали надосадочную жидкость. Определение уровня супероксидного анион-радикала (САР) и активности супероксиддисмутазы проводили по Чевари и др., активность каталазы (КТ) определяли по М. А. Каролук и др., а глутатионпероксидазы (ГПО) — по В. А. Пахомовой и др. Для измерений использовали спектрофотометр SF-mini 1240 (Schumadze, Япония). Количество супероксида и активность супероксиддисмутазы выражали в усл.ед/г, активность каталазы и глутатионпероксидазы — в мкат/кг ткани.

У крыс линии Вистар, и у мышей линии СВА/57 В1хк/Fl СД моделировали с помощью стрептозо-

тощина. У мышей индуцировали низкодозовый стрептозотоциновый диабет путем внутрибрюшинного введения цитостатика из расчета 40 мг/кг массы тела ежедневно на протяжении 5 суток. Этим путем достигалась абсолютная инсулиновая недостаточность, соответствующая инсулинзависимому типу сахарного диабета аутоиммунного генеза у человека. Относительную инсулиновую недостаточность у крыс создавали с помощью модели неонатального стрептозотоцинового диабета. Для этого 2-недельным крысятам вводили внутрибрюшинно стрептозотин из расчета 100 мг/кг массы тела. Эвтаназию животных производили под хлороформным наркозом: мышей через 2 и 6 месяцев от начала эксперимента, крыс — через 3 месяца. Всего для сравнительного гистологического сопоставления состояния сетчатой и сосудистой оболочек глаз животных с моделированным СД были использованы 48 объектов (по 16 глаз кроликов, крыс и мышей).

Результаты исследований обрабатывались статистически с использованием параметрических (среднее значение, стандарт распределения, стандартная ошибка среднего, достоверность различия средних по Стьюденту) и непараметрического (Вилкоксона – Манна – Уитни) критериев.

**Результаты и их обсуждение.** Изучение обзорных препаратов глаз (окрашенных гематоксилин-эозином) всех трех видов экспериментальных животных показало четкое различие нейродегенеративных изменений в слоях сетчатки при ДР, вызванной у животных с помощью интоксикации их дитизоном или стрептозотоцином.

В оцифрованном виде результаты послойного сравнения выраженности признаков нейродегенерации в сетчатке, заметные на обзорных препаратах, представлены в таблице 1. Приведенные в ней значения варьируют от нуля (нет дегенеративных изменений по сравнению с нормальной сетчаткой) до одного-двух баллов, где один балл — это выраженные изменения, а два — резко выраженные. При этом в ней представлены только конечные сроки наблюдения за животными. По ней легко видеть, что, прежде всего, заметны глубокие различия между сетчаткой кроликов и сетчатками крыс и мышей. Если в первом случае (у кролика), речь может идти о наличии более или менее резко выраженных признаков нейродегенерации во всех слоях сетчатки (пограничные мембраны здесь не рассматриваются), то в сетчатках крыс и мышей аналогичные изменения на обзорных гистологических препаратах практически не определяются. Именно поэтому мы полагаем возможным здесь сразу же оговориться, что все далее описываемые различия гистологической структуры слоев сетчатой оболочки кролика

(у крысы и мыши они отсутствуют) по сравнению с нормой являются статистически значимыми с высокой надежностью ( $P = 0,01$ ), определяемой по выше названному непараметрическому критерию.

Таблица 1  
Выраженность нейродегенеративных изменений в слоях сетчатки глаз животных с моделированным сахарным диабетом, баллы

Слои сетчатой оболочки	Вид животного и давность СД		
	Мышь, 26 нед.	Крыса, 13 нед.	Кролик, 16-17 нед.
Пигментный эпителий	0	0	2
Фоторецепторный слой	0	0	2
Наружный ядерный слой	0	0	2
Наружный сетчатый слой	0	0	2
Внутренний ядерный слой	0	0	2
Внутренний сетчатый слой	0	0	1
Слой ганглиозных клеток	0	0	1
Слой нервных волокон	0	0	1

Правда, и мы здесь хотим это подчеркнуть, что только что сказанное относится исключительно к рассматриваемому в таблице 1 сроку наблюдений за подопытными кроликами в 16-17 недель давности сахарного диабета, то есть к его развитой стадии. Что же касается ранних этапов наблюдения за этими животными, а именно фазы гипогликемии (через 6-7 часов после введения им дитизона) и начала фазы вторичной стойкой гипергликемии (через 33-36 часов после такой инъекции), то в это время какие-либо морфологические признаки повреждения сетчатки у них еще вообще отсутствовали. Хотя, как оказалось, уже имелись выраженные проявления окислительного стресса в сетчатой и сосудистой оболочках глаз таких животных [9]. Здесь следует подчеркнуть, что именно Cu/Zn супероксиддисмутаза (СОД) составляет не менее 85 % общей активности СОД. В клетках она обеспечивает защиту от окислительного стресса, вызванного супероксидом. Поэтому можно считать, что условия для развития такого стресса начинают создаваться уже на начальных этапах развития ДР (табл. 2).

Таблица 2  
Уровень супероксидного анионрадикала и активность антиоксидантных ферментов в комплексе сосудистой и сетчатой оболочек глаз кроликов в разные сроки после интоксикации дитизоном ( $M \pm m$ )

Показатель	Интактная группа	Срок после введения дитизона	
		6-7 ч	33-36 ч
Супероксидный анион-радикал, усл. ед./г	3,88 ± 0,25	3,39 ± 0,15	3,12 ± 0,19*
Каталаза, мкат/кг	11,84 ± 0,57	10,35 ± 0,32*	10,46 ± 0,42
СОД, усл. ед./г	1,26 ± 0,05	1,23 ± 0,06	1,05 ± 0,08*
Глутатионпероксидаза, мкат/кг	8,20 ± 0,49	6,71 ± 0,35**	6,60 ± 0,48*

Примечания: \* —  $P < 0,05$ , \*\* —  $P < 0,02$  по сравнению с интактной группой.

Следует отметить, что явление развития окислительного стресса в сетчатке было описано и при других моделях ДР, однако оно наблюдалось в гораздо более поздних сроках ее развития и было более выраженным [14, 16]. Такой стресс, как известно, ингибирует фагоцитарную способность пигментного эпителия сетчатки, а также способствует экспрессии в нем металлопротеиназ 1 и 3 [44]. Последние обладают субстратной специфичностью и деградируют коллагены первого–третьего типов, некоторые неколлагеновые белки и протеогликаны мембраны Бруха и неклеточного матрикса, окружающего клетки ПЭС [23]. К тому же эти металлопротеиназы, как и прочие представители этого класса ферментов (их имеется около 25), являются цинк-зависимыми, а следовательно их активность может, подобно супероксиддисмутазе, изменяться под влиянием хелатирующего действия использованного в наших экспериментах дитизона [37].

Еще одним, установленным нами через 33–36 час наблюдения изменением сетчатки, является ослабление интенсивности окрашивания гистохимически определяемых ШИК-положительных веществ (упомянутые протеогликаны из их числа) во внутренних сегментах фоторецепторов. Однако во всех других слоях сетчатки интенсивность ШИК-реакции и ее характер остаются нормальными.

При просмотре гистологических препаратов глаз кроликов с диабетом через 16–17 недель эксперимента прежде всего обращает на себя внимание не только наличие четко выраженных и легко определяемых изменений сетчатой оболочки, но и неодинаковая степень этих изменений в различных ее участках. В одних они проявляются более выражено, в то время как в других строение сетчатки изменено в меньшей степени. И это относится ко всем ее зонам как периферическим, так и лежащим вблизи головки зрительного нерва, мякотного шнура или зрительной полоски. Поэтому легко можно наблюдать соседствующие атрофичные

и сравнительно мало измененные участки сетчатки (рис. 1).

Что же касается конкретных изменений в различных слоях сетчатой оболочки, то в слое фоторецепторов они варьируют от выраженной вакуолизации в одних участках до его полного исчезновения в других. Иногда здесь же присутствуют меланин и ядра клеток наружного ядерного слоя. Сам же этот слой значительно истончен, т.е. в нем уменьшено количество рядов нейронов. К тому же, благодаря истончению вплоть до исчезновения наружного сетчатого слоя, нейроны внутреннего ядерного слоя часто оказываются расположенными среди клеток наружного ядерного слоя (см. рис. 1). Там же, где этот слой различим, он так же тоньше, чем в глазах контрольных (интактных) кроликов. При этом ядра некоторых нейронов внутреннего ядерного слоя увеличены в размерах, возможно за счет их полиплоидизации (рис. 2).

Внутренний сетчатый слой, в отличие от наружного, изменен меньше, благодаря чему и просматривается лучше. Интересно, что и в ганглиозном слое отмечается явное уменьшение количества нейронов, причем в нем заметны так же и клетки с вакуолизированными ядрами или лизирующиеся, утратившие ядра. Имеет место разрастание глиальных элементов разной интенсивности (рис. 3).

Благодаря наличию комплекса описанных изменений, толщина сетчатки сильно варьирует, так что по соседству могут встречаться как атрофированные, так и ее мало измененные участки (см. рис. 1). Изложенные изменения структуры нейросетчатки, разумеется, являются последствием наступившей клеточной смерти ее нейронов, однако ответ на вопрос о конкретных причинах этой смерти может быть получен только в результате специальных исследований. Таких причин, как известно, имеется три — апоптоз, аутофагия и некроз [30].

Рассмотрение характера изменений сетчатки кроликов с дитизиновым диабетом целесообразно

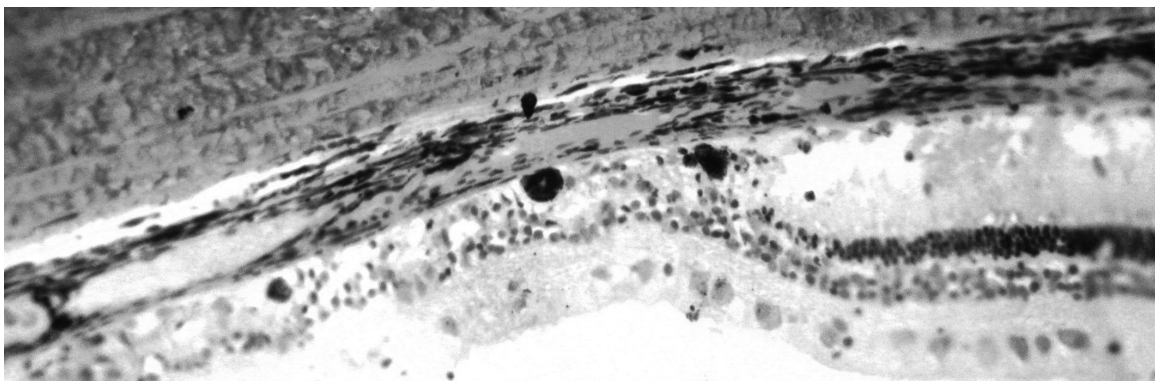


Рис. 1. Сетчатая, сосудистая и склеральная оболочки глаза кролика через 16 недель после введения дитизона. Сетчатая оболочка частично атрофирована (слева), в соседнем участке (справа) она в значительной мере сохранена (гематоксилин-эозин; об. 10, ок. 16).

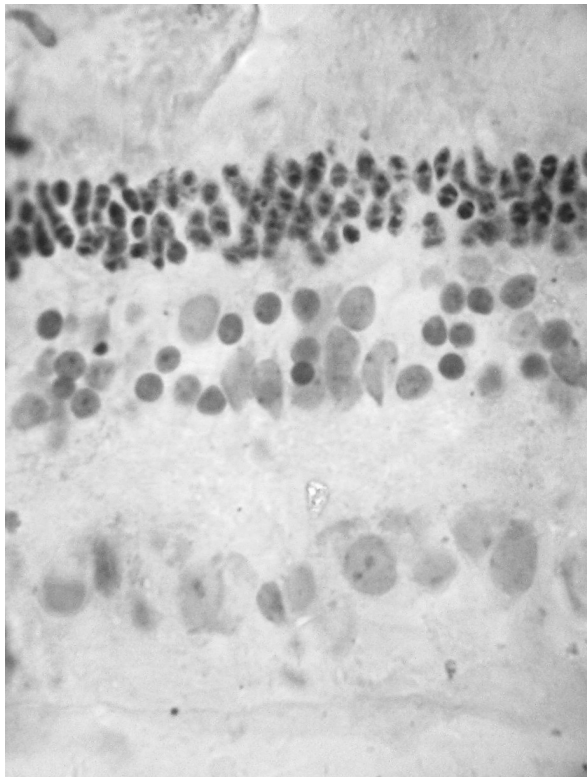


Рис. 2. Сетчатая оболочка глаза кролика через 16 недель после введения дитизона. Ядра некоторых нейронов внутреннего ядерного слоя увеличены в размерах (гематоксилин-эозин; об. 10, ок. 16).

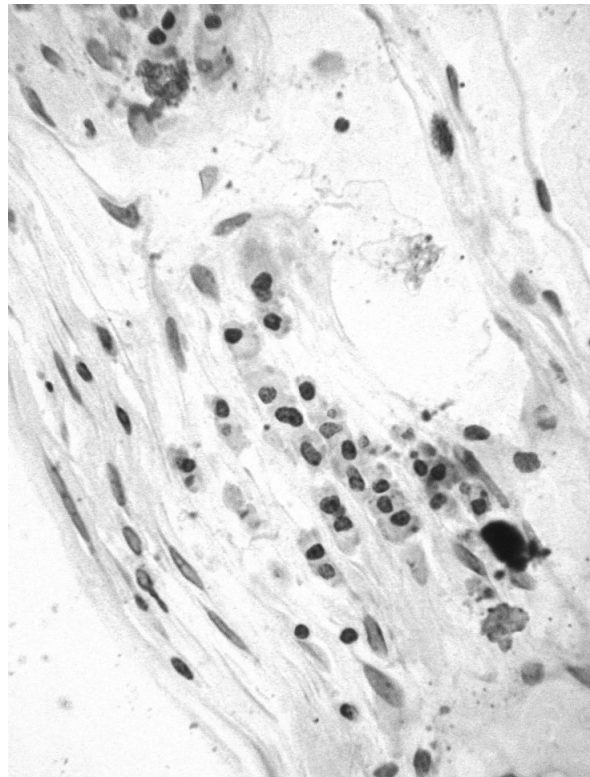


Рис. 3. Разрастание глиальных клеток в периферическом отделе сетчатки кролика через 16 недель после введения дитизона (гематоксилин-эозин; об. 40, ок. 6).

завершить ее структурным компонентом, не являющимся, строго говоря, нейросетчаткой, т. е. содержащей нейроны и нейроглию структурой, а именно — пигментным эпителием (ПЭС). Не останавливаясь здесь на его значении в обеспечении функционирования сетчатой оболочки (подробнее об этом см. [2]), укажем лишь, что ПЭС является источником собственного нейропротективного фактора соматостатина [33, 42] и важной составляющей гематофтальмического барьера. С этой точки зрения совершенно очевидно, что его грубые структурные повреждения вплоть до полного отсутствия клеток ПЭС на значительных участках сетчатки (рис. 4), несомненно, нарушают функционирование этого барьера и, как следствие, трофические процессы, протекающие в данной оболочке глаза.

Тем не менее, в других ее участках составляющие его клетки выглядят неповрежденными, сохраняют обычную форму, размеры, пигментные гранулы, округлые ядра (рис. 5). А далее заметно как они уплощаются, дегенерируют и, наконец, исчезают [13]. Последствия этого очевидны, особенно если принять во внимание отсутствие у ПЭС млекопитающих способности к регенерации [49].

Подчеркнем, что, говоря о состоянии ПЭС, следует помнить, что гистогенетически он, как и все остальные слои сетчатки, в эмбриогенезе является производным головного отдела нервной трубки, ее переднего мозгового пузыря, точнее, образующегося из него промежуточного мозга, непосредственно и служащего источником образования двух глазных пузырей. При превращении каждого из них в двухслойный глазной бокал его наружный слой дает начало пигментному эпителию сетчатки, в то время как из внутреннего слоя развиваются все остальные слои этой оболочки глаза. Они именуется нейросетчаткой и состоят из нейроглии и различного типа нейронов [18, 32]. И хотя сделанное нами описание структурных нарушений слоя пигментного эпителия сетчатки относится, напомним, к стадии развитого диабета у кроликов (16-17 недель после введения им дитизона), известно, что при стрептозотоциновой модели сахарного диабета нарушения метаболизма составляющих его клеток определяются уже гораздо раньше. В частности, Т. В. Олейник [15] сообщала о лабилизации лизосом клеток ПЭС и повышении активности кислой фосфатазы в цитозоле этих клеток уже через 10 и

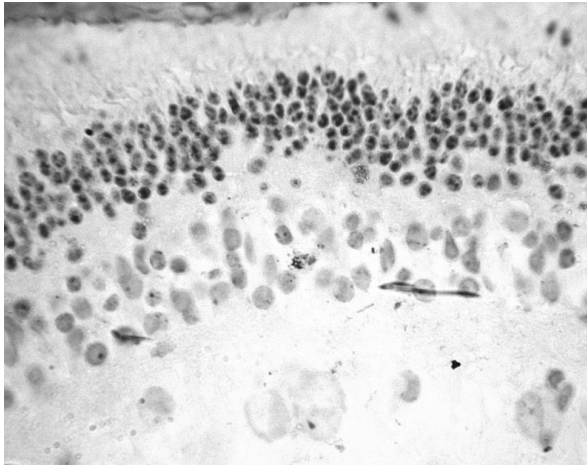


Рис 4. Сетчатая оболочка глаза кролика через 16 недель после введения дитизона. Клетки пигментного эпителия в ней отсутствуют (гематоксилин-эозин; об. 40, ок. 7).

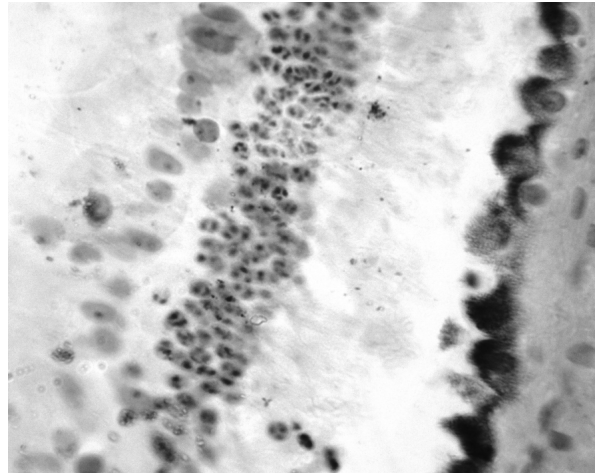


Рис 5. Сетчатая оболочка глаза кролика через 16 недель после введения дитизона. Клетки пигментного эпителия сохранены (гематоксилин-эозин; об. 40, ок. 7).

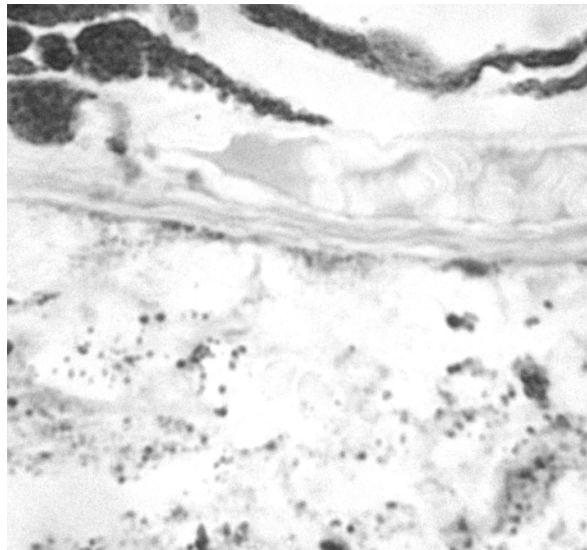


Рис 6. Сетчатая и сосудистая оболочки глаза кролика через 16 недель после введения дитизона. ШИК-положительный материал в сетчатке имеет вид зернистости разного размера; (реакция Мак Мануса – Хочкисса; об. 40, ок. 16).

28 суток после интоксикации крыс стрептозотоцином, а Н. Г. Завгородняя и С. В. Михальчик [4] прямо связывают положительный эффект от применения комплекса коротких каротиноидов у пациентов с ДР с улучшением функционального состояния клеток ПЭС.

Следует отметить, что в сетчатой оболочке глаз кроликов, досрочно выведенных из опыта за несколько недель до окончания эксперимента в связи с общим ухудшением их состояния, также отмечались все, подобные описанным выше, изменения.

Еще одним ярко выраженным последствием дитизинового диабета в глазу кролика является грубое нарушение характера и интенсивности ШИК-реакции в сетчатке. Она, во-первых, резко

ослаблена в описываемом сроке наблюдения, а во-вторых, приобретает иной характер отложение окрашенного продукта этой реакции в виде зерен различной величины (рис. 6).

При этом снижение активности антиоксидантных ферментов и накопление супероксида кислорода в сетчатке (о чем уже упоминалось выше) проявляются в ранних сроках эксперимента, т. е. тогда, когда еще нет заметных нарушений ШИК-реакции. Зато последние очень резко выражены при развитии диабета у кроликов. Впрочем, из литературы известно, что активность антиоксидантных ферментов остается сниженной при СД, вызванном у крыс стрептозотоцином, и при давности заболевания до 4 недель [14].

Особо подчеркнем, что подобные, легко определяемые морфологические изменения, характерные для сетчатой оболочки глаз кроликов с дитизиновым сахарным диабетом, совершенно не присущи глазам крыс и мышей со стрептозотоциновой моделью этого заболевания. Структура сетчатки глаз этих видов животных (при сопоставимых сроках наблюдения за ними) на окрашенных гематоксилин-эозином обзорных препаратах сохраняет обычное строение (рис. 7, 8). Сказанное относится как к нейросетчатке, так и пигментному эпителию (последний хорошо заметен на рис 7 вместе с сосудистой оболочкой, к которой он и прилежит). Справедливости ради заметим, что в литературе, тем не менее, имеются сведения как об отсутствии [27], так и о наличии нейродегенеративных проявлений ДР у этих видов лабораторных животных при СД, вызванном стрептозотоцином. Однако для их выявления требуется применение специальных методик, например, выявления апоптозирующихся клеток, кислого фибриллярного глиального белка и других [24, 36, 38].

Что же касается того факта, что в сетчатке кроликов с ДР, вызванной дитизиновым сахарным диабетом, нейродегенеративные изменения ее наружных слоев даже более выражены чем внутренних, то в этом плане весьма интересны новейшие морфологические исследования, проведенные А. А. Казарян и соавт. [5] у пациентов с СД 2 типа, но без ДР. Оказалось, что, даже без клинически видимой ДР, по данным ОКТ у них уже отмечается истончение всех слоев сетчатки в фовеальной зоне, снижение общей толщины сетчатки и наружных ее слоев в парафовеальной зоне, истончение только наружных слоев сетчатки в перифовеальной зоне. Исходя из этих данных, авторы полагают, что при

СД 2 типа без ДР первично поражаются наружные слои сетчатки, а с увеличением длительности заболевания и при прогрессировании СД в патологический процесс вовлекаются и внутренние ее слои. Такое более раннее снижение толщины наружных слоев сетчатки, по мнению этих авторов, возможно, связано с ранним поражением хориокапилляров, обеспечивающих их питание, и снижением толщины субфовеальной хориоидеи на 35%. К сказанному нам остается только добавить, что роль сосудистой оболочки в метаболизме сетчатки глаза кролика еще более велика чем у человека, учитывая практически отсутствие ее собственной васкуляризации. А многочисленные дефекты структуры сосудистой оболочки глаза кролика с дитизиновым СД в наших препаратах четко определялись при обычной световой микроскопии и были описаны в свое время в нашем первом сообщении на данную тему [8].

Все изложенные выше материалы позволяют высказать определенное мнение относительно перспектив использования модели ДР у кроликов с СД, индуцированным дитизином. Прежде всего, использование этой модели целесообразно при проведении тестирования средств и способов, направленных на торможение нейродегенеративных проявлений ДР. Последние, согласно современным представлениям, имеют место на самых ранних ее этапах, протекая одновременно или даже ранее сосудистых проявлений этого осложнения СД [24, 31]. Более того, высказано уже и мнение о том, что эти две группы патологических изменений сетчатой оболочки при СД могут иметь разные механизмы своего развития [25]. Поэтому нам представляется вполне правомочным констатировать, что для изучения сосудистых изменений сетчатки наилучшими объектами в экспериментальной работе

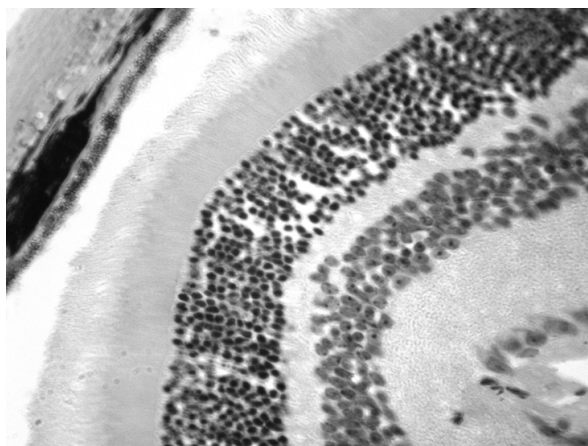


Рис 7. Сетчатая оболочка обычного строения глаза мыши через 9 недель после введения стрептозотоцина (гематоксилин-эозин; об. 40, ок. 7).

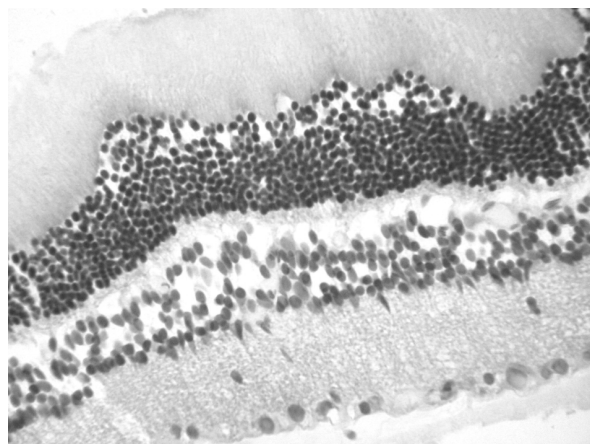


Рис 8. Сетчатая оболочка обычного строения глаза крысы через 26 недель после введения стрептозотоцина (гематоксилин-эозин; об. 40, ок. 7).

являются такие животные как крысы или мыши, имеющие васкуляризованную, подобно человеку, сетчатую оболочку [29]. Кролики, у которых эта оболочка васкуляризована только в области мягкотного шнура, для этой цели мало приемлемы, как, впрочем, и морские свинки [45]. У последних сетчатая оболочка вообще аваскулярна и работ по ее изменениям при СД практически нет [29]. Хотя вполне возможно, что для целей изучения явлений нейродегенерации при СД этот объект тоже может оказаться интересным не менее кролика. Пока же такие работы отсутствуют, хотя СД у этих животных моделировался, например, тем же стрептозотоцином [19]. Другими словами, исследование сосудистых и нейродегенеративных изменений сетчатки при изучении патогенеза ДР логично проводить на разных видах животных, как обладающих васкуляризованной сетчаткой, так и крайне слабо васкуляризованной либо вообще аваскулярной.

Следует отметить, что такой подход к моделированию ДР пока еще не применяется и, во всяком случае, отсутствует в наиболее известных обзорных работах на эту тему [22, 29, 36]. Практически все, что в них изложено имеет отношение исключительно к структурным, ультраструктурным и метаболическим изменениям, характерным для микрососудистой системы сетчатки. Хотя уже более десятилетия в литературе имеется немало сообщений о нейродегенеративных изменениях этой оболочки не только у экспериментальных животных, но и у человека. Достаточно упомянуть, например, такие данные как апоптозирование ганглиозных клеток сетчатки, гибель многих нейронов внутреннего ядерного слоя, фоторецепторов [21, 24, 36, 39]. Причем эти явления имеют место на ранних этапах развития ДР, т. е. тогда, когда еще даже могут быть не выражены сосудистые изменения. Однако, и это важно подчеркнуть особо, получены эти результаты после проведения морфометрических и цитохимических специальных методов исследования. Модель ДР при дитизоновом СД позволяет получить четкие признаки нейродегенерации сетчатки даже при использовании обычного простого обзорного окрашивания срезов.

Еще одним интересным для дальнейших исследований направлением научного поиска является детальное изучение состава ШИК-позитивных и ШИК-негативных компонентов сетчатой оболочки и характера качественных и количественных

изменений этого состава в процессе развития ДР. Установленный нами факт резких изменений содержания (в сторону уменьшения) и распределения ШИК-позитивных веществ в сетчатой оболочке кролика при развитии этого осложнения СД тем более важен, если вспомнить, что сам диабет именуется сахарным, отражая главную роль в его патогенезе патологии метаболизма именно углеводов. А ведь ШИК – положительные вещества и есть, в первую очередь, сложные углеводы [17]. Остается достойным удивления, что они были столь мало исследованы при ДР в сетчатке, в том числе и методами гистохимии. Здесь же уместно подчеркнуть, что в сетчатке мышей и, особенно, крыс эти ее углеводные компоненты содержатся в значительно меньших количествах чем у кролика, а при развитии у них ДР при СД, вызванном стрептозотоцином, ШИК-реакция в глазу мыши ослабляется [12]. Впрочем, о низком содержании гликогена (а это тоже одно из ШИК-положительных веществ) в сетчатке крыс сообщали в свое время *L. Sosula* и соавт. [43], уточняя при этом, что при количественной электронной микроскопии уже через месяц после введения животным стрептозотоцина отмечалось отложение его гранул в ганглиозных и биполярных нейронах сетчатки.

Можно полагать, что, с одной стороны, ШИК-положительные вещества сетчатки кролика, практически лишенной кровеносных сосудов, как-то связаны с ее трофическими процессами, а с другой стороны – играют важную роль в развитии ДР у этого вида животных. Правда, при этом остается неясным, что же является первичным в патогенезе ДР кролика – то ли нейродегенерация сопровождается изменениями ШИК-позитивных компонентов сетчатки, то ли изменения последних ведут к нейродегенерации. Во всяком случае, представляется весьма важным, в свете этих данных, проведение исследований углеводных компонентов сетчатки человека и их изменений при развитии у него ДР.

Приведенные в работе факты дают основание заключить, что дальнейшее изучение нейродегенеративных проявлений ДР при СД желательно проводить на одних моделях этого заболевания, а микрососудистых — на других. Выбор модели определяется целью исследования. Во всяком случае, представляется бесспорным, что фактическое отсутствие нейропротективного лечения ДР, требует для своей разработки и наиболее соответствующих ему моделей [41].



## Список использованной литературы

1. *Алексеев И. Б., И. Г. Воробьева, Л. Г. Михалева* и др. Результаты применения антиоксидантной терапии у пациентов с непролиферативной диабетической ретинопатией при сахарном диабете 2-го типа // *Вестн. офтальмол.*– 2013.– № 6.– С. 66-71.
2. *Вит В. В.* Строение зрительной системы человека.– Одесса: «Астропринт», 2003.– 655 с.
3. *Ефимов А. С., Германюк Я. Л., Генес С. Г.* Сахарный диабет.– Киев: Здоровье, 1983.– 224 с.
4. *Завгородняя Н. Г., С. В. Михальчик* Применение коротких каротиноидов для профилактики и лечения диабетической ретинопатии // *Мат-лы науч.-практ. конф. офтальмол. «Филатовские чтения»* (Одесса, 23–24 мая 2013 г).– Одесса, 2013.– С. 275-276.
5. *Казарян А. А., Овсепян Т. Р., Шишкин М. М.* Морфологическая характеристика макулярной зоны сетчатки у больных с сахарным диабетом 2-го типа без диабетической ретинопатии // *Рос. офтальмол. журн.*– 2013.– № 4.– С. 17-23.
6. *Кашинцева Л. Т., Мальцев Э. В., Думброва Н. Е.* и др. Изменения оболочек глаза при экспериментальном диабете и их фармакологическая коррекция // *Офтальмол. журн.*– 1997.– № 5.– С. 366-371.
7. *Мальцев Э. В., Зборовская А. В., Дорохова А. Э.* Нейродегенерация и нейропротекция при диабетической ретинопатии // *Офтальмол. журн.*– 2012.– № 1.– С. 67-72.
8. *Мальцев Э. В., Зборовская А. В., Дорохова А. Э.* Состояние сетчатой и сосудистой оболочек глаза кролика с сахарным диабетом, моделированным дитизином. Сообщение 1. Структурные изменения // *Офтальмол. журн.*– 2011.– № 6.– С. 20-27.
9. *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.
10. *Мальцев Э. В., Зборовская А. В., Дорохова А. Э.* Состояние сетчатой и сосудистой оболочек глаза кролика с сахарным диабетом, моделированным дитизином. Сообщение 3. PAS-позитивный материал // *Офтальмол. журн.*– 2012.– № 4.– С. 72-77.
11. *Мальцев Э. В., Зборовская А. В., Дорохова А. Э.* Состояние сетчатой и сосудистой оболочек глаза кролика с сахарным диабетом, моделированным дитизином. Сообщение 4. Сравнительное морфологическое сопоставление феномена нейродегенерации при дитизиновом и стрептозотоциновом диабете // *Офтальмол. журн.*– 2012.– № 5.– С. 60-66.
12. *Мальцев Э. В., Зборовская А. В., Дорохова А. Э.* Состояние сетчатой и сосудистой оболочек глаза кролика с сахарным диабетом, моделированным дитизином. Сообщение 5. Сравнительное морфологическое сопоставление PAS (ШИК)-позитивного материала при дитизиновом и стрептозотоциновом диабете // *Офтальмология. Восточная Европа.*– 2013.– № 1.– С. 63-74.
13. *Мальцев Э. В., Зборовская А. В., Дорохова А. Э.* и др. Состояние сетчатой и сосудистой оболочек глаза кролика с сахарным диабетом, моделированным дитизином: Сообщение 6. Сравнительное морфологическое сопоставление пигментного эпителия сетчатки при дитизиновом и стрептозотоциновом диабете // *Офтальмол. журн.*– 2013.– № 6.– С. 73-78.
14. *Олейник Т. В.* Влияние витаминно-коферментных комплексов на энзиматическую антиоксидантную систему сетчатки при экспериментальном диабете // *Офтальмол. журн.*– 2007.– № 6.– С. 58-61.
15. *Олейник Т. В.* Окислительное повреждение пигментного эпителия сетчатки при моделировании стрептозотоцинового диабета // *Офтальмол. журн.*– 2005.– № 3.– С. 47-49.
16. *Олейник Т. В.* Состояние процессов гашения свободно-радикальных форм кислорода при развитии экспериментального диабета // *Офтальмол. журн.*– 2006.– № 6.– С. 50-53.
17. *Принципы и методы гисто-цитохимического анализа в патологии* / Под ред. А. П. Авцына, А. И. Струкова, Б. Б. Фука.–Л.: «Медицина», Ленинградское отд., 1971.– 368 с.
18. *Пэттен Б. М.* Эмбриология человека.– М.: Медгиз, 1959.– 768 с.
19. *Сokoloverova И., Гаспарян Э., Ярошевский Ю., Никитин А.* Экспериментальный сахарный диабет. Роль в клинической диабетологии.– Л.: Наука, 1983.– 240 с.
20. *Шестакова М. В.* Роль тканевой ренин-ангиотензин-альдостероновой системы в развитии метаболического синдрома, сахарного диабета и его сосудистых осложнений (плерарная лекция) // *Сахарный диабет.*– 2010.– № 3.– С. 14-19.
21. *Aizu Y., Oyanagi K., Hu J., Nakagawa H.* Degeneration of retinal neuronal processes and pigment epithelium in the early stage of the streptozotocine-diabetic rats // *Neuropathology.*– 2002.– 22.– P. 161-170.
22. *Alder V. A., Su E. N., Yu D. Y.* et al. Overview of studies on metabolic and vascular regulatory changes in early diabetic retinopathy // *Austr. N. Z. J. Ophthalmol.*– 1998.– 26, № 2.– P. 141-148.
23. *Alge-Priglinger C. S., Kreutzer T., Obholzer K.* et al. Oxidative stress-mediated induction of MMP-1 and MMP-3 in human RPE cells // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*– 2009.– 50, № 11.– P. 5495-5503.
24. *Barber A. J.* A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.*– 2003.– 27, № 2.– P. 283-290.
25. *Barber A. J.* За развитие диабетической ретинопатии могут отвечать два механизма / A. J. Barber // *Новое в офтальмологии.* – 2011. – № 1. – С. 50-52.
26. *Brownlee M.* The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism // *Diabetes.*–2005.– 54, № 6.– P. 1615-1625.
27. *Bui B. V., Loeliger M., Thomas M.* et al. Investigating structural and biochemical correlates of ganglion cell dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats // *Exp. Eye Res.*–2009.– 88, № 6.– P. 1076-1083.
28. *Connolly K. M.* Oxidative stress in ocular diseases and the role of dietary antioxidants // *Euronews.*– 2008.– 15, № 3.– P. 35-38.
29. *Engerman R. L., T. S. Kern* Retinopathy in animal models of diabetes // *Diabetes/Metabolism Reviews.*– 1995.– 11, № 2.– P. 109-120.
30. *Fitzgerald M., C. Payne S., Bartlett C. A.* et al. Secondary retinal ganglion cell death and the neuroprotective effects of the calcium channel blocker lomerizine // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*– 2009.– 50, № 11.– P. 5456-5462.
31. *Gardner T. W., Abcouwer S. F., Barber A. J., Jackson G. R.* An integrated approach to diabetic retinopathy research // *Arch. Ophthalmol.*– 2011.– 129, № 2.– P. 230-235.

32. Grierson I., Hiscott P., Hogg P. et al. Development, repair and regeneration of the retinal pigment epithelium // *Eye*.– 1994.– **8**, № 2.– P. 255-262.
33. Hernandez C., Garcia-Ramirez M., Corraliza L. et al. Topical administration of somatostatin prevents retinal neurodegeneration in experimental diabetes // *Diabetes*.– 2013.– **62**.– P. 2569-2578.
34. Kanwar M., Kowluru R. A. Role of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase in the development and progression of diabetic retinopathy // *Diabetes*.– 2009.– **58**, № 1.– P. 227-234.
35. Kern T. S. *In vivo* models of diabetic retinopathy.– Diabetic retinopathy / Ed. E. Duh.– Totowa: Humana Press, 2008.– P. 137-158.
36. Kern T. S., Barber A. J. Retinal ganglion cells in diabetes // *J. Physiol*.– 2008.– **586**.– P. 4401-4408.
37. Kowluru R. A., Mohammfd G., dos Santos J. et al. Abrogation of MMP-9 gene protects against the development of retinopathy in diabetic mice by preventing mitochondrial damage // *Diabetes*.– 2011.– **60**.– P. 3023-3033.
38. Martin P. M., Roon P., Van Ells T. K. et al. Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*.– 2004.– **45**.– P. 3330-3336.
39. Park S. H., Park J. W., Park S. J. et al. Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina // *Diabetologia*.– 2003.– **46**.– P. 1260-1268.
40. Semkova I., Huemmeke M., Ho M. S. et al. Retinal localization of the glutamate receptor GluR2 and GluR2-regulating proteins in diabetic rats // *Exp. Eye Res*.– 2010.– **90**, № 2.– P. 244-253.
41. Silva K. S., Rosales M., Biswas S. K. et al. Diabetic retinal neurodegeneration is associated with mitochondrial oxidative stress and is improved by an angiotensin receptor blocker in a model combining hypertension and diabetes // *Diabetes*.– 2009.– **58**.– P. 1382-1390.
42. Simo R., Hernandez C. Neurodegeneration is an early event in diabetic retinopathy:therapeutic implications// *Br. J. Ophthalmol*.– 2012.– **96**, № 10.– P. 1285-1290.
43. Sosula L., Beaumont P., Hollows A. et al. Glycogen accumulation in retinal neurons and glial cells of streptozotocin diabetic rats. Quantitative electron microscopy // *Diabetes*.– 1974.– **23**, № 3.– P. 221-231.
44. Suofu Qin, Rodrigues G. A. Roles of alpha v beta 5 and MerTK in oxidative stress inhibition of RPE cell phagocytosis // *Exp. Eye Res*.– 2012.– **94**, № 1.– P. 63-70.
45. *The rabbit in eye research* / Eds: J. H. Prince. Ch. C. – Springfield, Ill, USA.: Thomas-publisher,– 1964.– 652 p.
46. Van Dijk H. W. Early neurodegeneration in the retina of type 2 diabetic patients / H. W. Van Dijk, F. D. Verbraak, P. H. Kok // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. – 2012. – Vol. 53. – P. 2715-2719.
47. Wei Zhang, Hua Yan Simvastatin increases circulating endothelial progenitor cells and reduces the formation and progression of diabetic retinopathy in rats // *Exp. Eye Res*.– 2012.– **105**, № 12.– P. 1-8.
48. Wright W. S., McElhatten R. M., Harris N. R. Increase of retinal hypoxia-inducible factor 2-alpha, but not hypoxia, early in the progression of diabetes in the rat // *Exp. Eye Res*.– 2011.– **93**, № 4.– P. 437-441.
49. Xia H., Krebs M. P., Kaushal S., Scott E. W. Enhanced retinal pigment epithelium regeneration after injury in MRL/MpJ mice // *Exp. Eye Res*.– 2011.– **93**, № 6.– P. 862-872.
50. Zheng Z., Chen H., Ke G. et al. Protective effect of perindopril on diabetic retinopathy is associated with decreased vascular endothelial growth factor-to-pigment epithelium-derived factor ratio. involvement of a mitochondria-reactive oxygen species pathway // *Diabetes*.– 2009.– **58**.– P. 954-964.

Получено 14.06.2016

**СТАН СІТЧАСТОЇ І СУДИННОЇ ОБОЛОНОК ОКА КРОЛИКА З ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ, МОДЕЛЬОВАНИМ ДИТИЗОНОМ: ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ ДИТИЗОНОВОЇ МОДЕЛІ ДІАБЕТИЧНОЇ РЕТИНОПАТІЇ**

**Е. В. Мальцев, О. В. Зборовська, О. Е. Дорохова**

Державна установа "Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України",  
65044 Одеса

У зв'язку з активним розвитком нейродегенеративної теорії патогенезу діабетичної ретинопатії (ДР) виникла необхідність розробки її моделей, при яких нейродегенеративні зміни структур сітківки яскраво виражені, розвиваються швидко і легко фіксуються спостерігачем. Досліди проводили на кроликах з дитизоновим цукровим діабетом (ЦД), а також на щурах і мишах зі стрептозотоциновим ЦД. На 16 тижні розвитку в кроликів дитизонового ЦД були визначені грубі, легко детектуємі дегенеративні зміни нейроепітелія й пігментного епітелію сітківки, що супроводжуються зниженням у ній вмісту ШИК позитивних речовин. У пацюків і мишей такі зміни були відсутні. Використання дитизонОВОЇ моделі ЦД доцільно при проведенні тестування засобів і способів, спрямованих на гальмування нейродегенеративних проявів ДР.

**STATE OF THE RETINA AND CHOROID OF RABBIT EYES WITH DITHIZONE DIABETES MELLITUS: PROSPECTS OF APPLICATION OF DITHIZONE MODEL OF DIABETIC RETINOPATHY**

**E. V. Maltsev, A. V. Zborovska, A. E. Dorokhova**

State institution "V. P. Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy NAMS Ukraine" 65044 Odessa

Due to the active development of neurodegenerative theories of pathogenesis of diabetic retinopathy (DR) it was necessary to develop models in which the neurodegenerative changes in the retinal structures were pronounced, developing quickly and easily fixed by observer. Experiments were carried out on rabbits with dithizone diabetes mellitus (DM) and also on rats and mice with streptozotocin diabetes. At week 16 of the development of dithizone DM rabbits were identified coarse, easily detectable degenerative changes of neuroepithelium and retinal pigment epithelium, accompanied by a decrease in its content PAS-positive substances. In rats and mice similar changes were absent. Using dithizone DM model is useful when carrying out testing of tools and methods aimed at inhibition of neurodegenerative manifestations of DR.