



УДК 616.4-008.6

Н. В. Кресюн

Нейродегенеративные изменения сетчатой оболочки глаз крыс со стрептозотоциновым диабетом в различных условиях экспериментального лечения

Одесский национальный медицинский университет

Ключевые слова: стрептозотоксин, дельта-сна пептид, электрическая стимуляция, мозжечок, диабетическая ретинопатия.

Применение антиоксидантов патогенетически обосновано при диабетической ретинопатии. С целью изучения влияния дельта-сон индуцирующего пептида и электрических стимуляций старой коры мозжечка на проявления диабетической ретинопатии у крыс линии Вистар введением стрептозотоцина (55 мг/кг, в/бр) моделировали сахарный диабет. Через 3 месяца отмечали снижение количества клеток наружного и внутреннего ядерных слоев сетчатки соответственно на 35,4% и в 2,2 раза, а в слое ганглионарных клеток – в 2,1 раза. На фоне применения дельта-сон индуцирующего пептида (50 мкг/кг, в/бр, один раз в 3 суток) и электрических стимуляций V–VII долек палеocerebellарной коры (100 Гц, два раза в сутки) на протяжении 2,5 месяца количество клеток наружного и внутреннего ядерных слоев сетчатки превышало таковое у крыс со стрептозотоциновым диабетом без лечения соответственно на 41,5% и на 53,1%, в то время как в слое ганглионарных клеток превышение составило 36,9%. Это свидетельствует о нейропротекторном эффекте дельта-сон индуцирующего пептида и электрических стимуляций мозжечка.

Нейродегенеративні зміни сітківки ока щурів зі стрептозотоциновим діабетом за різних умов експериментального лікування

Н. В. Кресюн

Застосування антиоксидантів є патогенетично обґрунтованим при діабетичній ретинопатії. З метою вивчення впливу дельта-сон індукуючого пептиду й електричних стимуляцій старої кори мозочка на прояви діабетичної ретинопатії у щурів лінії Вістар шляхом введення стрептозотоксину (55 мг/кг, в/очер) моделювали цукровий діабет. Через 3 місяці спостерігали зниження числа клітин зовнішнього та внутрішнього ядерних шарів сітківки відповідно на 35,4% та в 2,2 раза, а в шарі гангліонарних клітин – у 2,1 раза. На тлі використання дельта-сон індукуючого пептиду (50 мкг/кг, в/очер, один раз на 3 доби) і електричних стимуляцій V–VII дольок палеocerebellарної кори (100 Гц, двічі на добу) протягом 2,5 місяця число клітин зовнішнього та внутрішнього ядерних шарів сітківки перевищувало таке у щурів зі стрептозотоциновим діабетом без лікування відповідно на 41,5% та на 53,1%, а в шарі гангліонарних клітин перевищення становило 36,9%. Це свідчить про нейропротекторний вплив дельта-сон індукуючого пептиду й електричних стимуляцій мозочка.

Ключові слова: стрептозотоксин, дельта-сна пептид, електричне подразнення, мозочок, діабетична ретинопатія.

Запорізький медичний журнал. – 2014. – №4 (85). – С. 21–25

Neurodegenerative changes in retina of rats with streptozotocin diabetes under different conditions of experimental treatment

N. V. Kresyun

Aim. Usage of antioxidants is pathogenetically justified in diabetic retinopathy. With the aim of investigation of the effects of delta-sleep inducing peptide (DSIP) and electrical stimulation (ES) of paleocerebellar cortex upon diabetic retinopathy, in Wistar rats diabetes have been modeled via i.p. streptozotocin (STZ) administration (55,0 mg/kg, i.p.).

Methods and results. The net reduction of the cell number in outer and inner nuclear layers by 3,5 % and 2,1 times correspondently, as well as in ganglionar cell layer – by 2,1 times was established in three months from the moment of STZ. The number of cells in inner and outer nuclear layers exceeded those ones in not-treated diabetes rats by 41,5 % and 53,1 % correspondently, while in ganglionar cell layer the prevalence was by 36,9 % under conditions of treatment with DSIP (50 mcg/kg, i.p., one injection per three days) and ES of V-VII lobules of paleocerebellum (100 Hz, two times per day) during two and a half months.

Conclusion. That is in favor of neuroprotective activity of DSIP and cerebellar ES.

Key words: streptozotocin, diabetic retinopathy, delta sleep-inducing peptide, Electric Stimulation, Cerebellum.

Запорізький медичний журнал 2014; №4 (85): 21–25

Одним из характерных проявлений экспериментального диабета, индуцированного стрептозотоцином, является развитие ретинопатии [2,6]. В основе формирования диабетической ретинопатии – активирование прооксидантных механизмов в ткани сетчатой оболочки и повышение продукции эндотелиального фактора роста сосудов [2,6,9].

Ранее мы установили, что применение дельта-сон индуцирующего пептида (ДСИП) у животных со стрептозотоциновым вызванным сахарным диабетом оказывает протекторное действие в отношении гистоморфологических проявлений диабетической ретинопатии [3]. Препарат применяли начиная со второго месяца после индукции диабета и на протяжении последующих 2 месяцев каждые третьи сутки в дозе

50 мкг/кг, в/бр [3]. Также эффективным в предотвращении проявлений диабетической ретинопатии было применение электрических стимуляций (ЭС) палеocerebellарной коры, осуществляемое ежедневно [4].

Ранее эффективность сочетанного применения указанных факторов в отношении проявлений диабетической ретинопатии не изучали.

Цель работы

Изучение влияния сочетанного применения ДСИП и ЭС палеocerebellума в дозах и режимах, которые не были эффективны при самостоятельном применении, в отношении предотвращения нейродегенеративных изменений сетчатой оболочки при экспериментальном сахарном диабете.

Материалы и методы исследования

Исследования выполнены в условиях хронического эксперимента на крысах-самцах линии Вистар, которых содержали в стандартных условиях вивария Одесского национального медицинского университета (ОНМедУ). Каждые третьи сутки осуществляли взвешивание животных. Исследования проводили в соответствии с требованиями GLP и комиссии биоэтики ОНМедУ (протокол № 84 от 10 октября 2008 г.). Материалы статьи одобрены комиссией по биоэтике ОНМедУ.

Под кетаминным наркозом (100,0 мг/кг, в/бр) животным имплантировали биполярные нихромовые электроды (межэлектродное расстояние 0,25–0,3 мм) в дольки V–VII палеоцереbellарной коры, которые крепили к поверхности черепа с помощью быстротвердеющей зубоорудной пластмассы типа «Норакрил». Животных наблюдали начиная с 7–10 суток с момента проведения оперативного вмешательства.

Экспериментальный сахарный диабет вызывали в/бр введением натощак стрептозотоцина (СТЗ) в дозе 55,0 мг/кг («Sigma Aldrich.ru», Москва, РФ), который растворяли в буферном натриево-цитратном растворе (рН 4,5). Через 1 и 2 недели с момента применения СТЗ у животных в венозной крови, которую получали из хвостовой вены, определяли содержание глюкозы. В дальнейших наблюдениях использовали животных, у которых этот уровень составлял более 300 мг/л [3,4]. Определение содержания глюкозы проводили в 9.00, в условиях доступа животных к пище в ночное время. В течение всего наблюдения животным вводили инсулин (0–2 ед п/к 2–5 раз в неделю) [3,4].

Животных разделили на группы:

- 1) контроль – интактные крысы (11 животных);
- 2) с диабетом без лечения (11 крыс);
- 3) животные с диабетом, которым применяли ДСИП (10 крыс);
- 4) крысы, которым проводили ежедневные трехкратные ЭС палеоцереbellарной коры (10 животных);
- 5) животные с диабетом, которым применяли ДСИП и ЭС мозжечка (11 крыс).

На 15 сутки с момента применения СТЗ и на протяжении последующих 10 недель осуществляли ЭС палеоцереbellарной коры через предварительно имплантированные электроды. ЭС проводили с помощью прямоугольных импульсов силой тока 80–120 мкА, частотой импульсов 100 Гц, длительностью ЭС 2,5 с. Применяли ежедневные двукратные стимуляции (9.00; 19.00). ДСИП («Sigma-Aldrich Chemie GmbH», ФРГ) вводили в течение 10 недель каждые 3 суток в дозе 50 мг/кг, в/бр. Животным групп контроля вводили аналогичный объем физиологического раствора NaCl.

По окончании наблюдения осуществляли эвтаназию. После энуклеации глазное яблоко декапитуированных животных помещали на 24 ч в раствор, который содержал 75% пикриновой кислоты, 25% формалина, 5% уксусной кислоты. После фиксации удаляли роговицу, внутриглазную жидкость, хрусталик, стекловидное тело, а оставшиеся ткани дегидратировали с помощью 70–100% этилового

спирта. После этого ткань помещали в парафин и готовили срезы толщиной 5 мкм. Срезы сетчатки приготавливали, рассекая ее в сагитальном направлении в верхней части яблока, прилегающей к носовым костям, начиная с точки, отступавшей от края оптического диска на 1 мм вверх [8]. Приготовленные таким образом срезы окрашивали гематоксилин-эозином и исследовали с помощью светового микроскопа. Фотографии делали, используя цифровую фотокамеру Nikon DXM 1200 (Токио, Япония), которая была совмещена с Eclipse Nikon E-800 микроскопом. Все фото выполняли в прямоугольном формате 1280 × 960 пикселей и использовали увеличение объектива 40× и 10× для подсчета клеток. Подсчет проводили вручную на цифровых фотоснимках, а также используя разработанные нами программные средства. Результаты представлены в виде числа клеток/мм² ± SEM.

Результаты исследования обрабатывали статистически с применением метода ANOVA и теста Newman-Keuls. Расчеты проводили с применением программы «Primer Biostatistics» (США). Проверка характера распределения показала соответствие закону нормального распределения. Уровень достоверности принимали при $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

При морфологических исследованиях сетчатой оболочки гистологические нарушения оценивали по показателям снижения числа клеток, вакуолизацию цитоплазмы, наличию отека, дезорганизации и пикнотических нарушений со стороны ядра клетки. Такие проявления отсутствовали в гистологических препаратах животных группы контроля (рис. 1) и были выраженными у животных с моделированным СТЗ-диабетом (рис. 2). В этих условиях визуально определили выраженную дезорганизацию, вакуолизацию цитоплазмы клеток и пикнотические нарушения в наружном ядерном и слое ганглионарных клеток. В группе животных сочетанного применения ДСИП и ЭС палеоцереbellарной коры морфологические нарушения были менее выраженными (рис. 3).

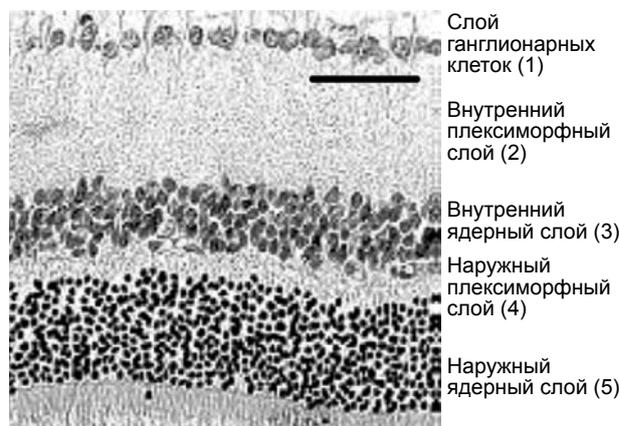


Рис. 1. Сетчатая оболочка глаза крысы группы контроля (интактное животное). Окраска гематоксилин-эозин.

Примечания: справа слои сетчатой оболочки; горизонтальная отметка – 50 мкм.

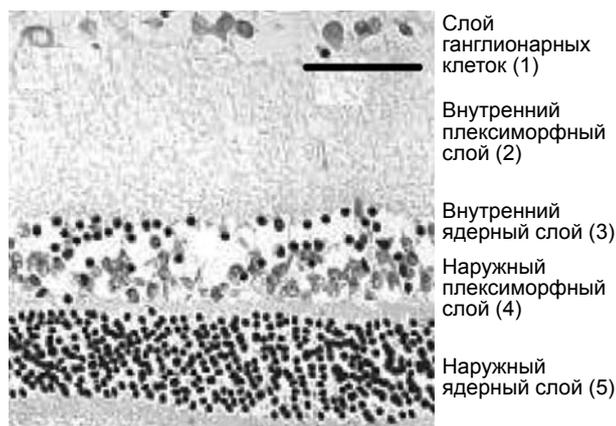


Рис. 2. Три месяца с момента применения СТЗ. Окраска гематоксилин-эозин.

Примечания: справа слои сетчатой оболочки; горизонтальная отметка – 50 мкм.

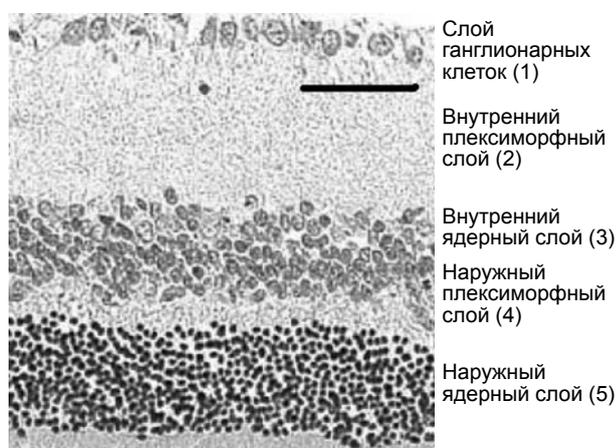


Рис. 3. Три месяца с момента моделирования диабета и 2,5 месяца от начала лечения с применением ДСИП и ЭС палеocerebellарной коры.

Примечания: справа слои сетчатой оболочки; горизонтальная отметка – 50 мкм.

Количественная оценка клеток показала, что в наружном ядерном слое у крыс с диабетом отмечалось снижение числа клеток в сравнении с таковым у крыс группы контроля на 35,4% ($P < 0,05$) (рис. 4). В группе крыс с диабетом, которым применяли ДСИП, аналогичные различия составили 24,4% ($P < 0,05$), а в группе с ЭС палеocerebellарной коры – 28,3% ($P < 0,05$). Данные показатели не имели достоверных различий в сравнении с группой животных с диабетом, не получавших лечение ($P > 0,05$). У животных с диабетом, которым проводили сочетанное применение ДСИП и ЭС коры мозжечка, число клеток в наружном ядерном слое было выше, чем у крыс с диабетом без лечения на 41,5% ($P < 0,05$) и оставалось на 8,7% меньшим, чем в группе интактных животных ($P > 0,05$).

Во внутреннем ядерном слое у животных с диабетической ретинопатией отмечено снижение числа клеток – в 2,2 раза ($P < 0,05$) (рис. 5). В группах животных с моделированным диабетом и применением ДСИП и ЭС мозжечка исследуемый показатель также был снижен в сравнении с контролем – в 1,94 и 1,86 раза соответственно ($P < 0,05$). В условиях сочетанного применения ДСИП и ЭС палеocerebellарной коры число клеток наружного ганглионарного слоя

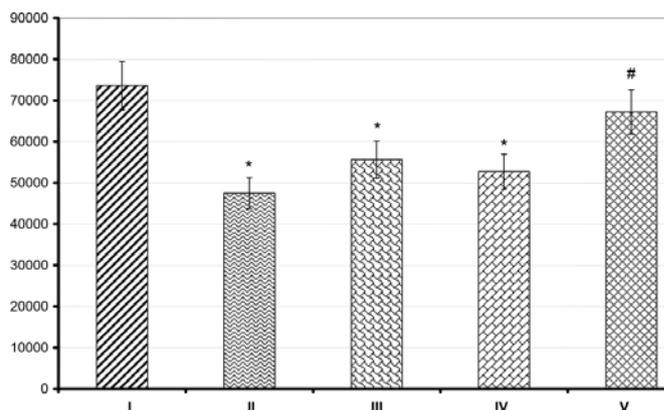


Рис. 4. Динамика плотности клеток наружного ядерного слоя сетчатки у крыс с диабетом и в различных условиях экспериментального лечения.

Примечания: по оси абсцисс: I – контроль (интактные крысы), II – крысы со стрептозотоцин-индуцированным диабетом, III – применение ДСИП (1 раз в неделю, 50 мкг/кг, в/бр), IV – ЭС палеocerebellарной коры, V – сочетанное применение ДСИП и ЭС палеocerebellарной коры; по оси ординат – число клеток/мм²; * – $P < 0,05$ в сравнении с группой I; # – $P < 0,05$ в сравнении с группой II.

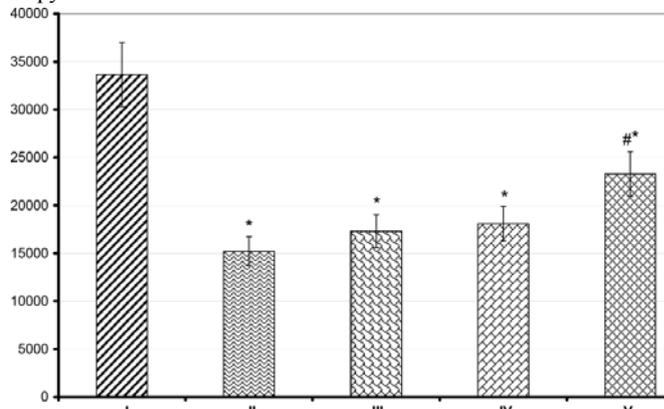


Рис. 5. Изменения числа клеток во внутреннем ядерном слое сетчатки у крыс со стрептозотоциновым диабетом в различных условиях экспериментального лечения.

Примечания: по оси абсцисс: I – контроль (интактные крысы), II – крысы со стрептозотоцин-индуцированным диабетом, III – применение ДСИП (1 раз в неделю, 50 мкг/кг, в/бр), IV – ЭС палеocerebellарной коры, V – сочетанное применение ДСИП и ЭС палеocerebellарной коры; по оси ординат – число клеток/мм²; * – $P < 0,05$ в сравнении с группой I; # – $P < 0,05$ в сравнении с группой II.

было на 53,1% большим в сравнении с таковым у крыс с диабетом без лечения ($P < 0,05$) и при этом оставалось на 30,8% меньшим в сравнении с аналогичным показателем у животных группы контроля ($P < 0,05$) (рис. 5).

В ганглионарном слое сетчатой оболочки у крыс с СД число клеток было в 2,1 раза меньшим в сравнении с таковым в группе интактных животных ($P < 0,05$) (рис. 6). В группах с отдельным применением ДСИП и ЭС мозжечка аналогичные различия составляли 1,79 и 1,93 раза ($P < 0,05$). На фоне сочетанного применения ДСИП и ЭС палеocerebellарной коры число клеток в ганглионарном слое превышало таковое в группе животных с СД без лечения на 36,9% ($P < 0,05$) и при этом оставалось меньшим, чем у животных группы контроля на 34,4% ($P < 0,05$) (рис. 6).

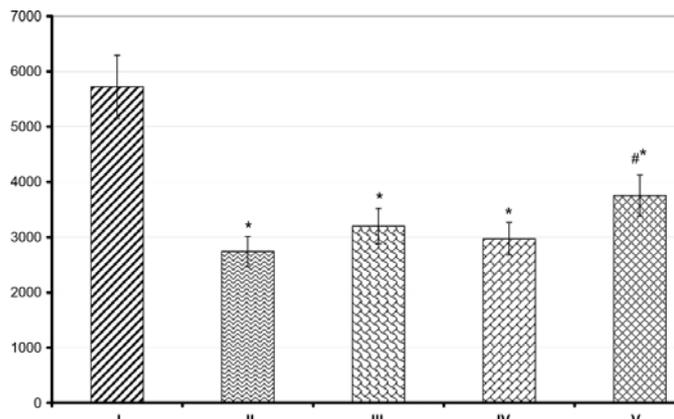


Рис. 6. Изменения числа клеток в ганглионарном слое сетчатки у крыс со стрептозотоциновым диабетом в различных условиях экспериментального лечения.

Обозначения: по оси абсцисс: I – контроль (интактные крысы), II – крысы со стрептозотоцин-индуцированным диабетом, III – применение ДСИП (1 раз в неделю, 50 мкг/кг, в/бр), IV – ЭС палеоцеребеллярной коры, V – сочетанное применение ДСИП и ЭС палеоцеребеллярной коры; по оси ординат – число клеток/мм²; * – $P < 0,05$ в сравнении с группой I; # – $P < 0,05$ в сравнении с группой II.

Полученные результаты показали, что развитие СТЗ-индуцированного диабета связано с выраженными нейродегенеративными изменениями ядерных и ганглионарного слоев сетчатой оболочки глаза. Следует отметить, что для данной модели экспериментального сахарного диабета характерны апоптотические изменения нейронов сетчатки, истончение наружного и внутреннего ядерных слоев, толщина которых может снижаться в сравнении с контролем в 4 и более раз [7,9]. В нашем исследовании наиболее выраженные дегенеративные изменения отмечены в наружном и внутреннем ядерных слоях сетчатки глаза, а в ганглионарном слое нейродегенерация была выражена в меньшей степени.

Совместное применение ДСИП и ЭС палеоцеребеллярной коры в дозах и режимах, которые при самостоятельном применении не сопровождались эффектом предотвращения нейродегенеративных нарушений, обеспечивало потенцированный протекторный эффект в отношении диабет-провоцированной утери нейронов сетчатой оболочки. Этот эффект был в наибольшей степени выражен в отношении нейронов наружного ядерного слоя. Воз-

можно, что в механизмах протективного действия ДСИП находятся его выраженные антиоксидантные свойства [1,5]. Однако следует заметить, что препарат обладает комплексным действием, которое обеспечивает неспецифическую стресс-протекцию, оказывает антидепрессивное действие, иммунокорректирующее влияние, реализующееся на уровне регуляции активности генома клетки [1]. Раздражение коры мозжечка также оказывает полифункциональный эффект, связанный с изменением активности нейромедиаторных систем, повышением антиоксидантного потенциала нервной ткани [4].

Представляют интерес данные, показывающие, что при ишемическом повреждении сетчатой оболочки глаза крысы протекторное действие в наибольшей степени отмечается при применении кетамина, блокирующего рецепторы возбуждающих аминокислот [8]. В меньшей степени – ламотриджина, который оказывает эффект в основном за счет снижения трансмембранного тока ионов натрия, хотя препарат был эффективным для предупреждения апоптоза клеток ганглионарного слоя. В наименьшей мере нейропротекцию отмечали в условиях применения нимодипина, блокирующего кальциевые каналы мембраны [8]. Можно полагать, что в основе выраженного протекторного влияния ДСИП и ЭС мозжечка находятся комплексные механизмы протекции, включающие снижение глутаматергических влияний на нейроны и обеспечивающие антиоксидантные эффекты.

Выводы

1. Формирование СТЗ-индуцированного диабета связано с нейродегенеративными изменениями со стороны нейронов сетчатой оболочки глаза, наиболее выраженные в наружном ядерном слое.

2. Сочетанное применение дельта сон-индуцирующего пептида и электрической стимуляции палеоцеребеллярной коры оказывает выраженный протекторный эффект в отношении нейродегенерации нейронов сетчатки при экспериментальном сахарном диабете.

Перспективы дальнейших исследований. Предполагается клиническая апробация совместного применения препаратов, содержащих дельта-сон индуцирующий пептид, и транскраниальных неинвазивных стимуляций коры мозжечка у пациентов, страдающих диабетической ретинопатией.

Список литературы

1. Войтенков В.Б. Дельта-сон индуцирующий пептид: итоги и перспективы / В.Б. Войтенков, И.И. Михалева. – Saarbrücken : LAP Lambert Academic Publishing, 2011. – 220 с.
2. Кресюн Н.В. Патологические механизмы формирования диабетической ретинопатии и обоснование подходов к ее терапии / Н.В. Кресюн // Интегративная антропология. – 2013. – № 1(21). – С. 43–48.
3. Кресюн Н.В. Гистологические изменения сетчатой оболочки глаза при экспериментальном сахарном диабете в условиях применения дельта сон-индуцирующего пептида / Н.В. Кресюн // Світ медицини і біології. – 2014. – № 2(44). – С. 124–127.
4. Кресюн Н.В. Перекисне окиснення ліпідів у сітківці ока щурів зі стрептозотоцин-індукованим диабетом за умов електричного подразнення палеоцеребеллярної кори / Н.В. Кресюн // Одеський медичний журнал. – 2014. – № 1(141). – С. 26–30.
5. Метаболические эффекты дельта-сон индуцирующего пептида при физиологическом старении / [Т.И. Бондаренко, Е.А. Майборода, И.И. Михалева, И.А. Прудченко] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – № 9. – С. 22–26.
6. Antonetti D.A. Diabetic retinopathy / D.A. Antonetti, R. Klein, T.W. Gardner // N.Engl.J.Med. – 2012. – Vol. 366. – № 13. – P. 1227–1239.
7. Effect of alpha-linolenic acid on streptozotocin – induced diabetic retinopathy indices *in vivo* / [J.H. Shen, Q. Ma, S.G. Shen et al.] // Archives of Medical Research. – 2013. – Vol. 44. – № 7. – P. 514–520.
8. Neuroprotection in acute ischemia and ischemia reperfusion in rat retina / [R. Guizzo, M.A.R. Cairrao, J. Coutinho-Netto et al.] // Internat.J.of Pharmacol. – 2005. – Vol. 1(5). – P. 369–365.



9. Streptozotocin induced diabetic retinopathy in rat and the expression of vascular endothelial growth factor and its receptor International / [C.Y. Gong, B. Lu, Q.W. Hu, L.L. Ji] // Journal of Ophthalmology.– 2013. – Vol. 6(5). – P. 573–577.

References

1. Vojtenkov, V. B. & Mikhaleva, I. I. (2011). *Del'ta-son induciruyushhij peptid: itogi i perspektivy [Delta sleep inducing peptide: results and perspectives]*. Saarbrücken: LAP Lambert Academic Publishing. [in Germany].
2. Kresyun, N. V. (2013). Patofiziologicheskie mekhanizmy formirovaniya diabeticheskoy retinopatii i obosnovanie podkhodov k ee terapii [Patophysiological mechanisms of diabetic retinopathy formation and justifying of the approaches to methods of it's treatment. Integrative Anthropology]. *Integrativnaya antropologija*, 21, 43–48. [in Ukrainian].
3. Kresyun, N. V. (2014). Gistologicheskie izmeneniya setchatoj obolochki glaza pri e'ksperimental'nom saharnom diabete v usloviyakh primeneniya del'ta son-induciruyushchego peptida [Histological deterioration of retina under conditions of experimental diabetes and delta-sleep inducing peptide administrations]. *Svit meditsiny i Biologii*, 44, 124–127. [in Ukrainian].
4. Kresyun, N. V. (2014). Perekysne oksyennia lipidiv u sitkivtsi oka shchuriv zi streptozotsyn-indukovabym diabetom za umov elektrychnoho podraznennia paleotserenralnoi kory [Lipid peroxidation in retina of rats with streptozotocin – induced diabetes under conditions of paleocerebellum electrical stimulation]. *Odeskyi medychnyi zhurnal*, 141, 26–30. [in Ukrainian].
5. Bondarenko, T. I., Maiboroda, E. A., Mikhaleva, I. I., & Prudchenko, I. A. (2013). Metabolicheskie e'ffekty del'ta-son induciruyushhego peptida pri fiziologicheskoy starenii [Metabolic effects of delta-sleep inducing peptide in course of physiological aging]. *E'ksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*, 9, 22–26. [in Russian].
6. Antonetti, D. A., Klein, R., & Gardner, T. W. (2012). Diabetic retinopathy. *Engl.J.Med.*, 366(13), 1227–1239. doi: 10.1056/NEJMra1005073.
7. Shen, J. H., Ma, Q., Shen, S. G., Xu, G. T., & Das, U. N. (2013). Effect of alpha-linolenic acid on streptozotocin – induced diabetic retinopathy indices *in vivo*. *Archives of Medical Research*, 44(7), 514–520. doi: 10.1016/j.arcmed.2013.09.010.
8. Guizzo, R., Cairrao, M. A. R., Coutinho-Netto, J., de Silva, A. R. M., Coimbra, N. C., & dos Santos, W. F. (2005). Neuroprotection in acute ischemia and ischemial reperfusion in rat retina. *Internat.J.of Pharmacol.*, 1(5), 369–365.
9. Gong, C. Y., Lu, B., Hu, Q. W., Ji, L. L. (2013). Streptozotocin induced diabetic retinopathy in rat and the expression of vascular endothelial growth factor and its receptor *Internat. J. of Ophthalmology*, 6(5), 573–577.

Сведения об авторе:

Кресюн Н. В., к. мед. н., доцент каф. офтальмологии, Одесский национальный медицинский университет,
E-mail: godlevsky@odmu.edu.ua

Поступила в редакцию 18.06.2014 г.