

© Коллектив авторов, 2009
УДК 617.735:611.018.8:616.379-008.64

*С.В. Логвинов, М.Б. Плотников¹, А.А. Жданкина, В.И. Смольякова¹, И.С. Иванов¹,
А.В. Кучин, И.В. Чукичева и Е.Ю. Варакута*

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОНОВ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА ПРИ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ И ИХ КОРРЕКЦИЯ ПРОИЗВОДНЫМ ИЗОБОРНИЛФЕНОЛА

Кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии (зав. — проф. С.В. Логвинов) Сибирского государственного медицинского университета, г. Томск; ¹ лаборатория фармакологии кровообращения (зав. — проф. М.Б. Плотников) Научно-исследовательского института Томского научного центра СО РАМН, e-mail: S_Logvinov@mail.ru

Наряду с микроангиопатией, одной из основных причин слепоты при диабетической ретинопатии является дегенерация нейронов сетчатки. С помощью электронной микроскопии и морфометрического анализа изучены структурные изменения нейросенсорных клеток, ассоциативных и ганглионарных нейронов сетчатки 30 белых беспородных крыс-самцов при стрептозотоциновом диабете длительностью 2 мес и оценено влияние нового полусинтетического антиоксиданта класса экранированных фенолов 4-метил-2,6-диизоборнилфенола. Показано, что деструктивным изменениям подвергаются наружные сегменты нейросенсорных клеток и ганглионарные нейроны. Снижается численная плотность нейросенсорных и ганглионарных клеток, увеличивается доля этих клеток с пикнотизированным ядром. 4-Метил-2,6-диизоборнилфенол оказывает нейропротекторное действие, препятствуя деструктивным изменениям нейросенсорных клеток и ганглионарных нейронов.

Ключевые слова: сетчатка, крыса, стрептозотоциновый диабет, изоборнилфенол.

Среди системных заболеваний, приводящих к слепоте в трудоспособном возрасте, первое место занимает сахарный диабет [8]. В Российской Федерации число больных сахарным диабетом составляет более 2 млн человек, инвалидность по зрению из них отмечается более чем у 10% [5]. Диабет ведет к глубоким изменениям микросудов сетчатки, глиальной дисфункции, а также нейрональной дегенерации, которая в настоящее время мало изучена [12]. Патогенез диабетической ретинопатии связывают, прежде всего, с общими нарушениями гомеостаза при сахарном диабете: увеличением содержания в крови всех фракций липидов, нарушением реологических свойств крови и микроциркуляции, белкового и ионного обмена, угнетением активности ферментных систем, увеличением интенсивности свободнорадикального окисления [1, 3, 5]. Значительный интерес в качестве перспективных протекторов повреждения клеток при патологиях, сопровождающихся появлением активных форм кислорода, представляют препараты антиоксидантной группы [4]. 4-Метил-2,6-диизоборнилфенол — новый полифункциональный антиоксидант из группы экранированных фенолов, обладающий антиоксидантными свойствами [2, 6], гемореологической, антитромбоцитарной и антитромбогенной активностью [7].

Целью настоящего исследования явилось изучение морфологических изменений нейросенсор-

ных клеток (НК), ассоциативных и ганглионарных нейронов сетчатки при стрептозотоциновом сахарном диабете (ССД) и коррекции производным изоборнилфенола.

Материал и методы. Эксперименты проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г.) на 20 белых беспородных половозрелых крысах-самцах массой 200–250 г, которым воспроизвели сахарный диабет путем однократного внутрибрюшинного введения стрептозотина в дозе 15 мг/100 г массы. Критерием тяжести служили уровень гипергликемии (свыше 15 ммоль/л), потеря массы тела, выраженность полиурии и полидипсии. Через 30 сут после введения стрептозотина крысы были разделены на 2 группы: крысы 1-й группы (n=10) с концентрацией глюкозы $22,4 \pm 2,0$ ммоль/л ежедневно в течение 30 сут получали внутривенно 4-метил-2,6-диизоборнилфенол в дозе 100 мг/кг массы тела, взвешенный в 1 мл крахмальной слизи; крысы 2-й группы (n=10) с концентрацией глюкозы $23,4 \pm 2,0$ ммоль/л получали эквивалентное количество крахмальной слизи. Контрольную группу составили интактные животные (n=10), которых содержали с экспериментальными в идентичных условиях вивария. Материалом исследования служили сетчатки глаз, изъятые после умерщвления крыс передозировкой паров эфира через 60 сут после введения стрептозотина. Центральные участки задней стенки глаза фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида на 0,2 М какодильном буфере (pH 7,4), дополнительно фиксировали в 2% растворе четырехоксида осмия и заливали в смесь эпоны-аралдита. Полутонкие срезы окрашивали толуидиновым синим, ультратонкие — контрастировали уранилцетатом и цитратом свинца, просматрива-

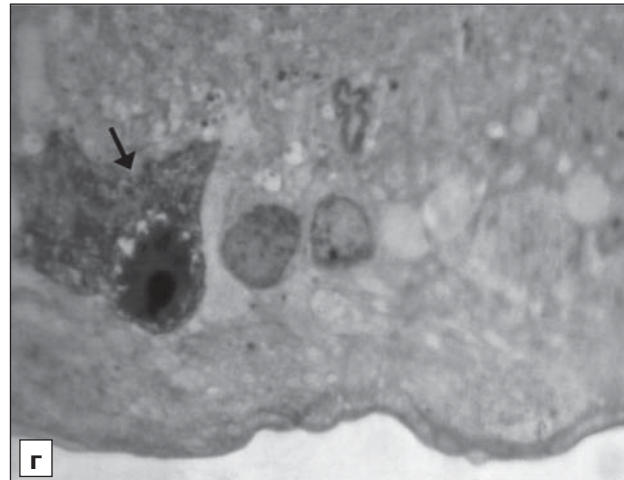
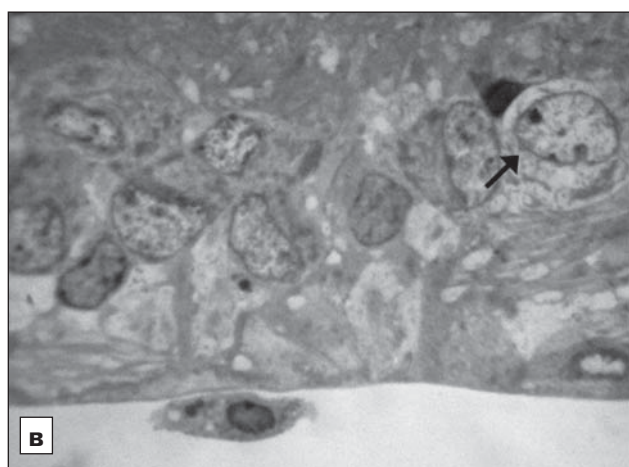
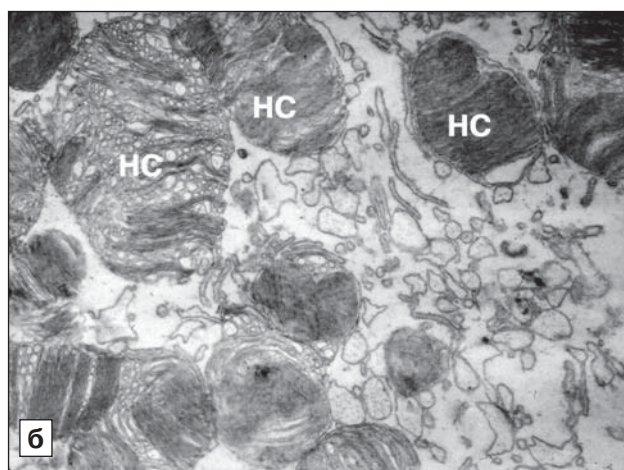
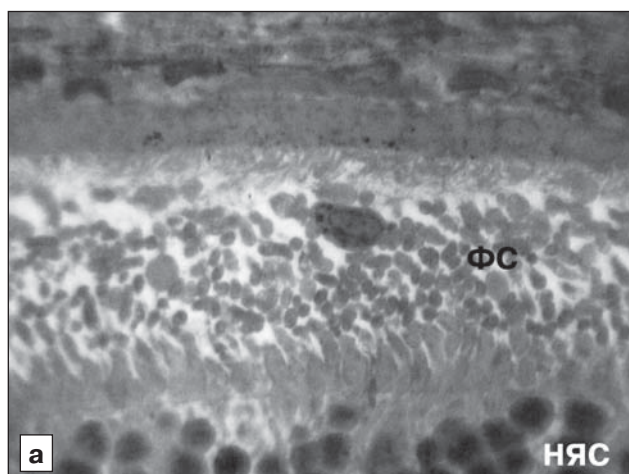
ли и фотографировали в электронном микроскопе JEM-7A (Япония). На полутонких срезах подсчитывали НК с пикнотизированным ядром, ганглионарные нейроны с тотальным, очаговым хроматолизом и измененные по темному типу. С помощью окулярной измерительной сетки Автандилова определяли численную плотность ядер в наружном ядерном слое на площади 900 мкм^2 . Для оценки значимости различий при сравнении средних величин использовали непараметрический критерий Манна–Уитни.

Результаты исследования. Через 2 мес после моделирования ССД у животных развиваются деструктивные изменения НК и ганглионарных нейронов сетчатки, тогда как все виды ассоциативных нейронов остаются относительно интактными. Наблюдается фрагментация наружных сегментов НК (рисунок, а), расслоение и вакуолярная дегенерация мембранных дисков (см. рисунок, б). Большинство внутренних сегментов сохраняют нормальное строение, в единичных — отмечаются набухание и отек митохондрий, исчезновение крист. В субретинальном

пространстве имеет место миграция макрофагов из кровеносного русла (см. рисунок, а).

Перикарионы НК различного размера, у некоторых клеток наблюдается деформация ядер. Разрастаются гипертрофированные склеральные отростки радиальных глиоцитов, увеличивается количество НК, характеризующихся повышением осmioфилии ядра и цитоплазмы, встречаются клетки с отеком цитоплазмы, возрастает содержание НК с пикнотизированными ядрами (табл. 1). Некоторые ядра НК смещаются в фотосенсорный и наружный сетчатый слой.

В группе животных с коррекцией ССД производным изоборнилфенола изменения по характеру сходны с описанными выше, но менее выражены (см. табл. 1). У животных с ССД без лечения происходит увеличение доли НК с пикнотизированными ядрами в 3 раза по сравнению с контролем. Введение же 4-метил-2,6-диизоборнилфенола предотвращает деструкцию НК, снижая данный пока-



Нейросенсорные клетки (а, б) и ганглионарные нейроны (в, г) сетчатки глаза крыс при стрептозотоциновом диабете длительностью 2 мес.

а — фрагментация наружных сегментов нейросенсорных клеток; б — расслоение, фрагментация, вакуолярная дегенерация мембран наружных сегментов фоторецепторов; в — очаговый хроматолиз ганглионарного нейрона (стрелка); г — пикноморфный ганглионарный нейрон (стрелка). НЯС — наружный ядерный слой; ФС — фотосенсорный слой; НС — наружные сегменты. а, в, г — полутонкие срезы. Окраска толудиновым синим. Ув.: а — 900; б — 6500; в, г — 800.

Таблица 1

Показатели деструкции наружного ядерного слоя сетчатки глаза крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом и при его коррекции 4-метил-2,6-диизоборнилфенолом ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Группы животных	Доля нейросенсорных клеток с пикнотизированным ядром (%)	Численная плотность ядер нейросенсорных клеток на 900 мкм ² среза
Контроль	0,20±0,020	35 990±454
Диабет	0,63±0,06*	24 210±2478*
Диабет+изоборнилфенол	0,24±0,03**	24 528±1982*

* Здесь и в табл. 2: различия при сравнении с показателями у контрольных животных значимы при $P < 0,05$.

** Различия между показателями групп без коррекции и на фоне лечения производным изоборнилфенола значимы при $P < 0,05$.

затель до значений у контрольной группы. Вместе с тем, численная плотность ядер НК в наружном ядерном слое снижается по сравнению с тем же показателем у интактных крыс и животных с коррекцией в 1,49 и 1,47 раза соответственно, что, вероятно, связано с глиальной пролиферацией при диабете и разрастанием в наружном ядерном слое склеральных отростков радиальных глиоцитов.

Изменения мультиполярных нейронов сетчатки животных со ССД характеризуются в основном хроматолизом различной степени выраженности (см. рисунок, в). На электронно-микроскопическом уровне наблюдаются изменения гранулярной и агранулярной эндоплазматической сети, цистерны которых изогнуты и фрагментированы, некоторые резко расширены и служат местом образования вакуолей. Отмечается снижение содержания в цитоплазме рибосом, деструкция митохондрий с исчезновением крист. Встречаются также изменения ганглионарных нейронов по «темному типу» с деформацией, повышением осmioфилии ядра и редукцией органелл в цитоплазме (см. рисунок, г).

Анализ количественных изменений ганглионарных нейронов в сетчатке глаза экспериментальных животных (табл. 2) позволил выявить положительное влияние производного изоборнилфенола. В группе животных без лечения доля нейронов с очаговым и тотальным хроматолизом увеличивается в 10 раз по сравнению с тем же показателем в контроле. В 3,8 раза увеличивается доля пикноморфных ганглионарных нейронов. Введение производного изоборнилфенола ограничивает развитие деструктивных изменений ган-

глионарных нейронов, что выражается в значимом снижении всех исследованных показателей.

Обсуждение полученных данных. Метаболические сдвиги, происходящие в сетчатке при развитии диабетической ретинопатии, такие как гипергликемия, ишемия ткани сетчатки, аутооксидация глюкозы, снижение активности Na, K-АТФазы, ведут к уменьшению активности антиоксидантной системы — окислению глутатиона, снижению активности глутатионпероксидазы, каталазы, супероксиддисмутазы и увеличению образования свободнорадикальных соединений [11], что способствует деструкции НК, главным образом, наружных сегментов фоторецепторов. Проведенные нами исследования показали, что ССД вызывает деструктивные изменения НК — фрагментацию и вакуольную дегенерацию наружных сегментов, пикноз ядер и отек перикарионов, разрастание склеральных отростков радиальных глиоцитов, активно фагоцитирующих разрушенные НК, количественный анализ выявил трехкратное увеличение доли НК с пикнотизированными ядрами.

По данным литературы, гипергликемия при сахарном диабете и активация полиолового пути метаболизма глюкозы во многом способствуют развитию деструктивных изменений нейронов внутренних слоев сетчатки и апоптотической их гибели [9–12]. В нашем исследовании показана низкая чувствительность нейронов внутреннего ядерного слоя к стойкой длительной гипергликемии, тогда как нейроны ганглионарного слоя подвергаются и реактивным, и деструктивным

Таблица 2

Содержание ганглионарных нейронов сетчатки глаза крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом и при его коррекции 4-метил-2,6-диизоборнилфенолом ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Группы животных	Доля пикноморфных нейронов (%)	Доля нейронов с очаговым хроматолизом (%)	Доля нейронов с тотальным хроматолизом (%)
Контроль	1,5±0,3	3,55±0,23	0,80±0,18
Диабет	5,9±0,5*	37±6*	8,5±1,2*
Диабет+изоборнилфенол	1,2±0,7**	24,3±2,6***	5,9±1,2***

изменениям. На первый план выступают хроматолитические изменения ганглионарных нейронов, в несколько меньшей степени увеличивается число пикноморфных ганглионарных нейронов.

4-Метил-2,6-диизоборнилфенол способствует снижению дегенерации НК и ганглионарных нейронов, что, вероятно, связано, главным образом, с проявлением антиоксидантных свойств препарата [2, 6]. Снижение окислительного напряжения в сетчатке способствует стабилизации мембран наружных сегментов нейросенсорных клеток и митохондриальных мембран ганглионарных нейронов, что приводит к улучшению функции тканевого дыхания и повышению устойчивости нейронов к патологическим процессам в условиях стойкой гипергликемии.

Таким образом, показан нейропротекторный эффект 4-метил-2,6-диизоборнилфенола в отношении НК и ганглионарных нейронов сетчатки при длительном ССД.

ЛИТЕРАТУРА

- Балаболкин М.И. и Клебанова Е.М. Роль окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений сахарного диабета (лекция). Тер. арх., 2000, т. 73, № 4, с. 3–8.
- Иванов И.С. и Смольякова В.И. Влияние производного о-изоборнилфенола на показатели перекисного окисления липидов в тканях головного мозга при ишемии у крыс. В кн.: Науки о человеке: материалы IX конгресса молодых ученых и специалистов. Томск, изд. СибГМУ, 2008, с. 111–112.
- Кравчук Е.А. Роль свободнорадикального окисления в патогенезе заболеваний глаз. Вестн. офтальмол., 2004, № 5, с. 48–51.
- Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М., Фирма «Слово», 2006.
- Миленькая Т.М., Щербачева Л.Н. и Терентьев В.С. Диабетическая ретинопатия, диагностика, лечение. Рос. мед. журн., 1998, т. 6, № 12, с. 8–15.
- Плотников М.Б., Иванов И.С., Смольякова В.И. и др. Новые производные изоборнилфенола — основа для разработки средств профилактики и лечения тромбофилических состояний. В кн.: Химия и медицина: Тезисы докладов VI Всероссийского научного семинара с Молодежной научной школой. Уфа, Гилем, 2007, с. 80–81.
- Плотников М.Б., Смольякова В.И., Иванов И.С. и др. Гемореологическая активность производных о-изоборнилфенола. В кн.: «Гемореология и микроциркуляция»: Материалы международной конференции. Ярославль, Изд-во ЯГПУ им. К.Д. Ушинского, 2007, с. 160.
- Хавинсон В.Х., Трофимова С.В. Биорегуляторные пептиды в лечении диабетической ретинопатии. В кн.: Тезисы докл. VII съезда офтальмологов России. М., изд. центр Федорова, 2000, ч. 1, с. 335.
- Asnaghi V., Gerhardinger C., Hoehn T. et al. A role for the polyol pathway in the early neuroretinal apoptosis and glial changes induced by diabetes in the rat. Diabetes, 2003, v. 52, № 2, p. 506–511.
- Bensaoula T. and Ottlecz A. Biochemical and ultrastructural studies in the neural retina and retinal pigment epithelium of STZ-diabetic rats: effect of captopril. J. Ocul. Pharmacol. Ther., 2001, v. 17, № 6, p. 573–586.
- Ceriello A., Bortolotti N., Motz E. et al. Meal-induced oxidative stress and low-density lipoprotein oxidation in diabetes: the possible role of hyperglycemia. Metabolism, 1999, v. 48, № 12, p. 1503–1508.
- 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, v. 45, p. 3330–3336.

Поступила в редакцию 16.01.09

MORPHOLOGICAL CHANGES OF RETINAL NEURONS IN RATS WITH STREPTOZOTOCIN DIABETES AND THEIR CORRECTION BY O-ISOBORNYLPHENOL DERIVATIVE

S.V. Logvinov, M.B. Plotnikov, A.A. Zhdankina, V.I. Smolyakova, I.S. Ivanov, A.V. Kuchin, I.V. Chukichyova and Ye.Yu. Varakuta

Along with microangiopathy, degeneration of retinal neurons is one of the basic causes of blindness in patients with diabetic retinopathy. Using the electronic microscopy and morphometric analysis, the structural changes of neurosensory cells, associative and ganglionic retinal neurons were studied in 30 albino outbred male rats with long term (2 months) streptozotocin diabetes and the effect of a new semisynthetic antioxidant belonging to a group of strictly hindered phenols (4-methyl-2,6-diisobornylphenol) on these parameters was evaluated. In diabetic rats, the destructive changes of external segments of neurosensory cells and ganglionic retinal neurons were found. The numerical density of neurosensory and ganglionic cells was reduced, while the proportion of these cells with pyknotic nuclei was increased. 4-Methyl-2,6-diisobornylphenol demonstrated neuroprotective effect by preventing destructive changes of neurosensory cells and ganglionic retinal neurons.

Key words: retina, rat, streptozotocin diabetes, isobornylphenol.

Department of Histology, Cytology and Embryology, Siberian State Medical University, Laboratory of Pharmacology of Circulation, Scientific Research Institute, Tomsk Scientific Center, RAS SB