

Патологические изменения сетчатки глаза крыс при экспериментальном сахарном диабете 2 типа и их коррекция оральными гелями с биологически активными веществами

В. В. Вит¹О. Ю. Цисельская²Ю. В. Цисельский²А. П. Левицкий³

¹ ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова НАМН Украины», Одесса, Украина

² КУ «Одесская областная клиническая больница», Одесса, Украина

³ ГУ «Институт стоматологии НАМН Украины», Одесса, Украина

РЕЗЮМЕ

Цель. Изучение лечебно-профилактического воздействия на сетчатку глаза крыс с экспериментальным сахарным диабетом 2 типа (СД2) оральных мукозальных гелей, содержащих БАВ.

Методы. СД2 вызывали с помощью протамина по методу Ульянова и Тарасова [5] путем внутримышечного введения протамин сульфата в дозе 4,5 мг/кг 2 раза в день (утром и вечером). В качестве БАВ использовали лизоцим, муку из виноградных листьев, водный экстракт из ягод черники и кверцетин. Мукозальные гели, содержащие БАВ, наносили на слизистую полости рта в течение 2 недель. В сыворотке крови определяли концентрацию глюкозы и осуществляли гистологические исследования сетчатки глаза.

Результаты. Применение мукозальных гелей с БАВ снижает на 8-22% уровень глюкозы крови и значительно улучшает гистологическую картину сетчатки глаза (менее выражена вакуольная дегенерация ганглиозных клеток, отсутствуют структурные изменения фоторецепторного слоя). Более эффективными оказались гели, содержащие экстракт из ягод черники, виноградной муки или кверцетин.

Заключение. Оральные аппликации мукозальных гелей, содержащие БАВ, оказывают ретинопротекторное действие при экспериментальном диабете у крыс.

Ключевые слова: глаз, сетчатка, сахарный диабет, мукозальные гели, черника, кверцетин, виноград, лизоцим

ABSTRACT

V. V. Vit, O. Yu. Tsiselskaya, Yu. V. Tsiselskiy, A. P. Levitskiy

Pathological changes in the retina of eyes rats with experimental 2 type diabetes mellitus and their correction by oral gels with biologically active substances

Purpose: To study of therapeutic and prophylactic action on the retina of rats with experimental diabetes mellitus type 2 (DM2) oral mucosal gels containing biologically active substances (BAS).

Methods: DM2 was induced by protamine method Ulyanov and Tarasova [2000]. As BAS used lysozyme, flour of grape leaves, the water extract of blueberries and quercetin. Mucosal gels containing active substances, applied to the mucous lining of the mouth for 2 weeks. The serum glucose concentration was performed and histological studies of the retina.

Results: Application mucosal gels reduces BAS 8-22% glucose (most with blueberry extract) and significantly improves retinal histology (vacuolar degeneration less pronounced ganglion cells, there are no structural changes in photoreceptor layer). Gels revealed more effective with containing extract of bilberry, grape flour and quercetin.

Conclusion: Oral mucosal application of gels containing active substances, have protection of retina in diabetes mellitus type 2.

Key words: the eye, the retina, 2 type diabetes mellitus, oral gels, bilberry, quercetin, grapes, lysozyme

Таблица 1. Группы крыс с экспериментальным СДБ2, получавших оральные аппликации гелей с БАВ

| №№ п/п | Группы | Препарат | Доза на 1 крысу в день |
|--------|-----------------------|--|-------------------------|
| 1 | Норма (интактные) | — | — |
| 2 | СДБ2+плацебо | «пустой» гель КМЦ | 0,5 мл |
| 3 | СДБ2+лизоцим | гель с лизоцимом 2 мг/мл | 0,5 мл, 1 мг лизоцима |
| 4 | СДБ2+виноградная мука | гель с мукой из виноградных листьев 20 мг/мл | 0,5 мл, 10 мг муки |
| 5 | СДБ2+черника | водный экстракт черники (4,9% экстрактивных веществ) | 2 мл с питьевой водой |
| 6 | СДБ2+кверцетин | гель с кверцетином 2 мг/мл | 0,5 мл, 1 мг кверцетина |

Ранее нами были показаны глубокие гистологические и биохимические изменения в сетчатке глаза крыс при экспериментальном сахарном диабете 1 и 2 типов, аналогичные тем, которые возникают при генерализованном дисбиозе или системной эндотоксинемии [1]. На этом основании было предложено использовать в качестве лечебно-профилактических средств препараты пребиотиков, инулина, биологически активное вещество ЭКСО, кверцетин [2-4].

Целью настоящего исследования явилось дальнейшее изучение лечебно-профилактического действия на сетчатку глаза крыс с экспериментальным сахарным диабетом 2 типа новых препаратов, обладающих антидисбиотическим действием — лизоцима, муки из виноградных листьев и водного экстракта из ягод черники. В качестве препарата сравнения был использован биофлавоноид кверцетин. Особенность данного исследования состояла в том, что все препараты биологически активных веществ (БАВ) использовали в виде аппликаций на слизистую оболочку полости рта (СОПР) мукозальных гелей, содержащих эти БАВ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использованы следующие материалы и реактивы: лизоцим из яичного белка («Aflact instant», производства «Chr. Hansen», Дания); кверцетин, х.ч. («Merck», Германия); протамин сульфат в ампулах по 10 мл с концентрацией 10 мг/мл (производитель — ЗАО «Индар», Украина); мука из виноградных листьев (после измельчения в кофемолке листьев винограда сорта Изабелла); водный экстракт из ягод черники с концентрацией экстрактивных веществ 4,9%. Остальные реактивы отечественного и импортного производства имели квалификацию ч.д.а. или х.ч.

Эксперименты проведены на 18 белых крысах линии Вистар (самцы в возрасте 5 месяцев, живая масса 260±10 г). У 15 крыс воспроизводили сахарный диабет 2 типа (СДБ2) по методу Ульянова и Тарасова [5] путем внутримышечного введения раствора протамин сульфата в дозе 18 мг/кг дважды в день в течение двух недель.

Все крысы были разделены на 6 равных групп:

Таблица 2. Содержание глюкозы в сыворотке крови крыс с СДБ2, получавших оральные аппликации гелей с БАВ

| №№ п/п | Группы | Глюкоза, ммоль/л |
|--------|-----------------------|----------------------------|
| 1 | Норма | 5,92±0,19 |
| 2 | СДБ2+плацебо | 7,12±0,20; p<0,01 |
| 3 | СДБ2+лизоцим | 6,54±0,41; p>0,05; p1>0,05 |
| 4 | СДБ2+виноградная мука | 6,55±0,21; p<0,05; p1>0,05 |
| 5 | СДБ2+черника | 5,55±0,30; p>0,1; p1<0,05 |
| 6 | СДБ2+кверцетин | 6,27±0,24; p>0,1; p1<0,05 |

Примечание. p — показатель достоверности различий с группой № 1; p1 — показатель достоверности различий с группой № 2.

1-ая — интактная; 2-ая — СДБ2 + плацебо (гель без БАВ); 3-ья — СДБ2 + гель с лизоцимом; 4-ая — СДБ2 + гель с виноградной мукой; 5-ая — СДБ2 + экстракт черники и 6-ая — СДБ2 + гель с кверцетином. Все БАВ использованы в виде мукозальных гелей на 2,5%-ном КМЦ (натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы) (табл. 1), которые наносили на слизистую оболочку полости рта животного в количестве 0,5 мл один раз в день в течение 2 недель (за 30 минут до кормления).

Умерщвление животных осуществляли в соответствии с «Международными правилами» под тиопенталовым наркозом (20 мг/кг) путем тотального кровопускания. Извлекали глаза и помещали их в 10% нейтральный раствор формалина, затем заключали в парафин, делали срезы и окрашивали их гематоксилин-эозином. Фоторегистрацию структурных изменений проводили с использованием микроскопа Jenamed 2 и фотоаппарата Canon 5.

В сыворотке крови определяли концентрацию глюкозы [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В таблице 2 представлены результаты по содержанию глюкозы в сыворотке крови крыс с экспериментальным сахарным диабетом при использовании оральных гелей с БАВ. Как видно из этих данных,

у крыс с диабетом, у которых не использовали аппликации с гелями, содержащими БАВ, наблюдается достоверное увеличение содержания глюкозы в сыворотке. Применение аппликаций гелями с БАВ снижает содержание глюкозы в сыворотке на 8-22%, причем в наибольшей степени при воздействии водного экстракта черники.

Гистологическое исследование сетчатки глаз крыс с СДБ2 показало, что в сенсорной части сетчатой оболочки обнаруживаются патологические изменения преимущественно внутреннего сетчатого слоя, слоя ганглиозных клеток и слоя нервных волокон. Это находит выражение в отеке ганглиозных клеток и уменьшении их количества. Изменения сетчатого слоя и слоя нервных волокон проявляются разволокнением аксонов ганглиозных клеток и наличием пустот, заполненных серозной жидкостью (рис. 1). При этом имеет место отек цитоплазмы ганглиозных клеток, исчезает цитоплазматическая зернистость, часть ядер приобретает пузырьковидный вид, а часть подвергается пикнозу. Клетки округляются и значительно увеличиваются в размерах, отмечается выраженный клеточный полиморфизм, чередуются участки плотного расположения ганглиозных клеток с пикнотически измененными ядрами и участками с полным отсутствием клеток. В случаях наиболее выраженного отека и дегенерации нейронов внутренние слои сетчатой оболочки принимают сетчатый вид. Постоянно отмечается фокальное разрушение внутренней пограничной мембраны, сопровождающееся скоплением в преретинальном пространстве стекловидного тела продуктов распада части ганглиозных клеток и единичных эритроцитов, иногда обнаруживается фокальное разрушение слоя нервных волокон.

Патологические изменения выявляются и в кровеносных сосудах сетчатой оболочки, преимуще-

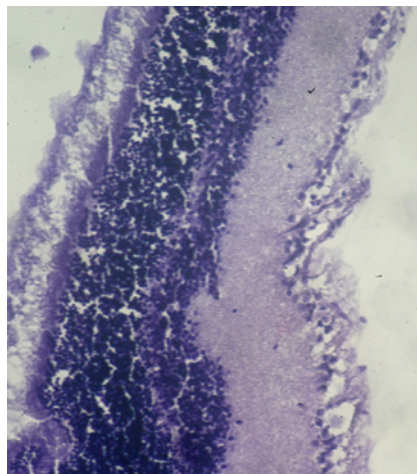


Рисунок 1. Сетчатка крысы при воспроизведении СДБ2. Разволокнение слоя нервных волокон с формированием псевдокист, заполненных серозной жидкостью. Выраженный отек цитоплазмы ганглиозных клеток. Дегенерация части нейронов. Гематоксилин-эозин. X 280.

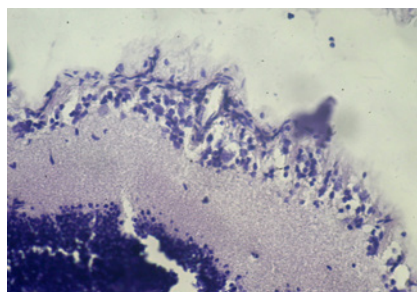


Рисунок 2. Сетчатка крысы при воспроизведении СДБ2. Утолщение стенки артериальных сосудов, сопровождающееся эксфолиацией эндотелиальной выстилки. Вокруг сосудов определяются фокальные пролифераты, отражающие начальные этапы глиоза. Гематоксилин-эозин. X 340.

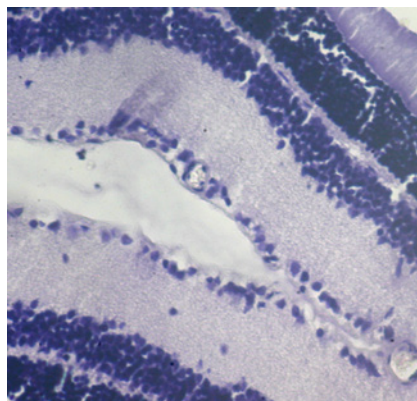


Рисунок 3. Сетчатка крысы при воспроизведении СДБ2 и использовании экстракта ягод черники. Отмечается отсутствие структурных изменений всех слоев сетчатой оболочки. Видны неизмененные артериальные сосуды, расположенные в слое ганглиозных клеток. Гематоксилин-эозин. X 340.

ственно располагающихся в ее внутренних слоях. Изменения касаются как артериальных, так и венозных сосудов. Стенка артериальных сосудов неравномерно утолщена, эндотелиальные клетки отекающие и местами отсутствуют, вокруг сосудов определяются пространства, заполненные серозной жидкостью. Кроме того, вокруг сосудов видны также фокальные пролифераты, состоящие из круглых клеток и отражающие начальные этапы глиоза сетчатой оболочки (рис. 2). Венозные сосуды извилистые, иногда со спаившейся стенкой, а иногда их просвет облитерирован в результате пролиферации эндотелиальных клеток. В отдельных случаях вблизи капиллярных сосудов видны базофильно окрашивающиеся гомогенные участки, представляющие собой, по всей видимости, дегенеративно измененные нервные волокна. При наиболее выраженных изменениях сетчатки вокруг сосудов образуются муфты из клеток с округлыми светлыми ядрами и слабо базофильной цитоплазмой. Встречаются также гомогенные эозинофильные скопления, представляющие собой диффузное пропитывание плазмой крови и отражающие нарушение проницаемости кровеносных сосудов. В некоторых случаях имеет место гемолиз эритроцитов внутри просвета кровеносных сосудов. Каких-либо изменений артерий и вен среднего калибра (центральной артерии и вены сетчатки, расположенных в области диска зрительного нерва) не обнаружено.

Вышеприведенные структурные изменения сосудов сетчатой оболочки предполагают возможность развития в ней серьезных нарушений кровообращения. Об этом свидетельствует как наличие отека внутренних слоев сетчатой оболочки, так и нередко обнаруживающиеся фокальные кровоизлияния, определяемые чаще всего во внутренних слоях сетчатки (внутренний ядерный и вну-

тренний плексиформный слой). При этом во внутренних слоях сетчатки наблюдаются полости, заполненные эритроцитами, и нарушение гистоархитектоники наружного и внутреннего ядерных слоев.

Сравнительный анализ структурных изменений сетчатой оболочки экспериментальных животных при использовании различных препаратов также выявил вышеприведенные изменения, но имеющие меньшую степень выраженности. По большей части это касается вакуольной дегенерации ганглиозных клеток в различных участках сетчатой оболочки. Отсутствует истончение слоя ганглиозных клеток и отек слоя нервных волокон. Кроме того, гистоархитектоника сетчатой оболочки не изменена, не определяются и структурные изменения фоторецепторного слоя. Наиболее сохранной является сетчатая оболочка при применении таких препаратов, как виноградная мука, экстракт ягод черники и кверцетин (рис. 3, 4). В этих случаях практически отсутствует отек ганглиозных клеток, а структурные изменения сосудистой системы сетчатки минимальны (отек эндотелиальных клеток, отсутствие периваскулярных муфт, состоящих из глиальных элементов, отсутствие периваскулярного отека).

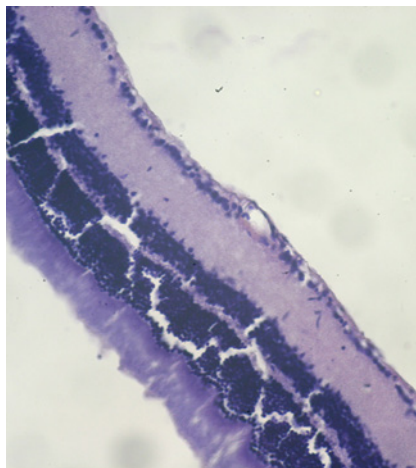


Рисунок 4. Сетчатка крысы при воспроизведении СДБ2 и использовании виноградной муки. Отмечается сохранение структуры сетчатой оболочки, включая слой фоторецепторных клеток. Гематоксилин-эозин. X 280.

ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Проведенные исследования показали, что в сетчатке глаза крыс с диабетом имеют место существенные изменения воспалительно-дистрофического характера, обусловленные, прежде всего, нарушениями кровообращения. Эти данные согласуются с ранее полученными результатами наших исследований [2].

Аппликации на слизистую оболочку полости рта гелей с БАВ приводят к снижению уровня гипергликемии и в значительной степени устраняют воспалительно-дистрофические изменения в сетчатке глаза. Эти данные свидетельствуют о перспективности нового пути введения препаратов, содержащих полифенольные вещества и обладающих антидисбиотическим дей-

ствием, при этом возможно их использовать в значительно меньших количествах, чем при интрагастральном пути введения.

Учитывая наиболее сильное гипогликемическое действие водного экстракта ягод черники, считаем целесообразным дальнейшее изучение его эффектов в клинических условиях для профилактики и лечения диабетической ретинопатии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Левицкий А.П., Цисельский Ю.В. Дисбиоз, диабетическая ретинопатия и пребиотики. Одесса; 2012, 196 с.
2. Левицкий А.П., Цисельский Ю.В. Використання пребіотиків для профілактики стоматологічних ускладнень у хворих на цукровий діабет (методичні рекомендації). – Київ, 2010, 18 с.
3. Цисельский Ю.В., Дем'яненко С. О., Віт В.В. и др. // Эндокринология. – 2010; 15 (додаток): 76.
4. Левицкий А.П., Цисельский Ю.В. Применение биофлавоноидов для профилактики и лечения диабетической ретинопатии (методические рекомендации) // Киев, 2008, 19 с.
5. Ульянов А.М. Инсулярная система животных при хроническом дефиците гепарина/А.М. Ульянов, Ю.А. Тарасов // Вопросы медицинской химии. – 2000. – Т. 46, № 2. – С. 149-154.
6. Горячковский А.М. Клиническая биохимия в лабораторной диагностике. – Одесса, 2005, 607 с.

REFERENCES

1. Levitskiy A.P., Tsiselskiy Yu.V. Disbioz, diabeticheskaja retinopatija i prebiotiki [Disbioz, diabetic retinopathy and prebiotics]. Odessa, 2012. 196 p. (in Russ.).
2. Levits'kiy A. P., Tsiselskiy Yu. V. Viktoristannya prebiotikiv for profilaktiki stomatologichny uskladnen' at hvoryh on tsukrovij diabet [Application of prebiotics at stomatologic complications at patients with diabetes]. – Kiiv, 2010. 18 p. (in Russ.).
3. Tsiselskiy Yu. V., Dem'yanenko S. O., Vit V.V. i dr. // Endokrinologija [Endocrinology]. – 2010; 15 (do-datok): 76. (in Russ.).
4. Levitskiy A.P., Tsiselskiy Yu.V. Primenenie bioflavonoidov dlja profilaktiki i lechenija diabeticheskoy retinopatii [Application bioflavonoids for prevention and treatment of a diabetic retinopathy (methodical recommendations)] // Kiev. 2008. 19 p. (in Russ.).
5. A. M. Ul'yanov, Yu. A. Tarasov. Insulyn system of animals at chronic deficiency of heparin. Voprosy meditsinskoy khimii [Biomedicine chemistry] – 2000. – T. 46, № 2. – p. 149-154. (in Russ.).
6. Goryachkovskiy A.M. Klinicheskaja biokhimiya v laboratornoj diagnostike [Clinical biochemistry in laboratory]. Odessa, 2005, 607 p. (in Russ.).