



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/мм<sup>2</sup> ± 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).

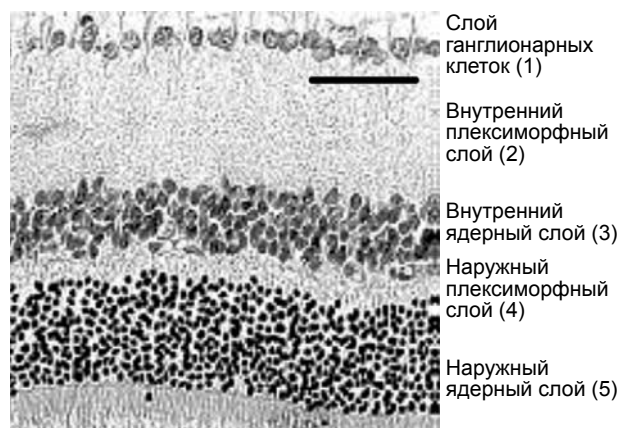


Рис. 1. Сетчатая оболочка глаза крысы группы контроля (интактное животное). Окраска гематоксилин-эозин.

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

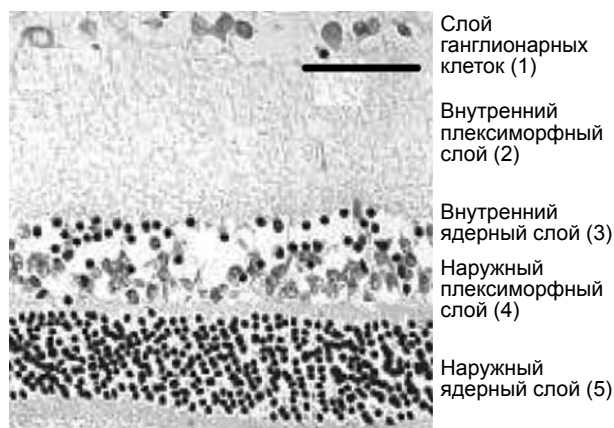


Рис. 2. Три месяца с момента применения СТЗ. Окраска гематоксилин-эозин.

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

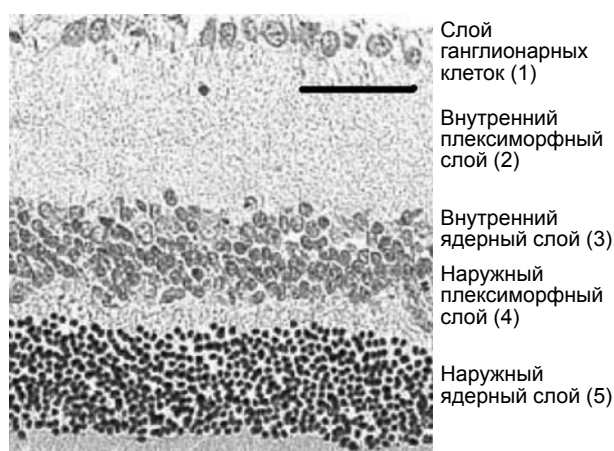


Рис. 3. Три месяца с момента моделирования диабета и 2,5 месяца от начала лечения с применением ДСИП и ЭС палеocerebellарной коры.

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 палеocerebellума число клеток наружного ганглионарного слоя

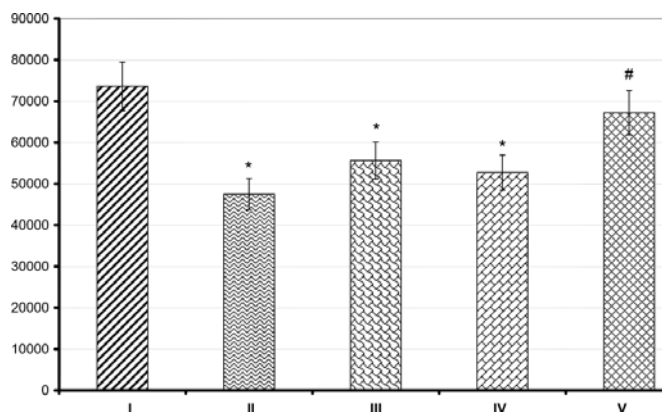


Рис. 4. Динамика плотности клеток наружного ядерного слоя сетчатки у крыс с диабетом и в различных условиях экспериментального лечения.

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.

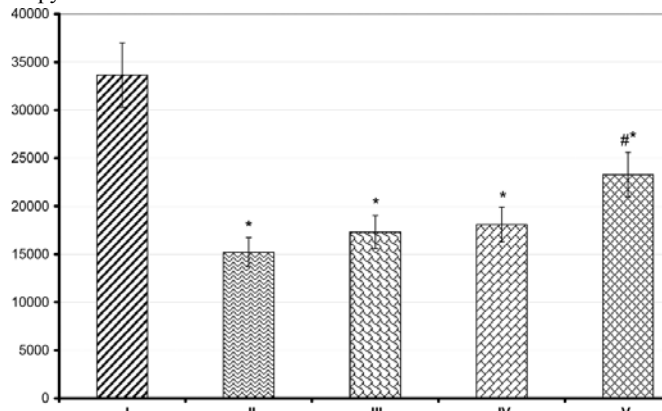


Рис. 5. Изменения числа клеток во внутреннем ядерном слое сетчатки у крыс со стрептозотоциновым диабетом в различных условиях экспериментального лечения.

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).

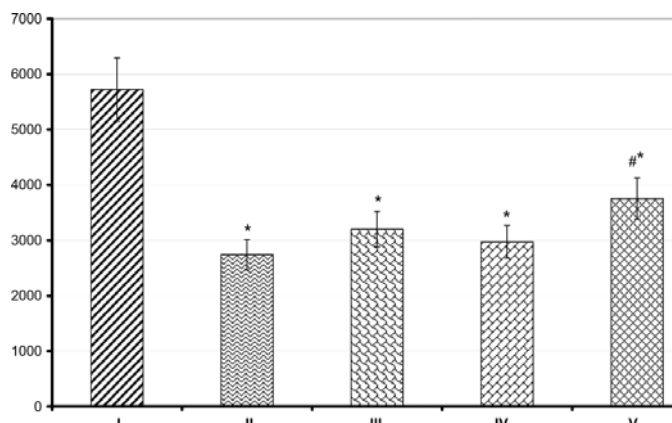


Рис. 6. Изменения числа клеток в ганглионарном слое сетчатки у крыс со стрептозоточиновым диабетом в различных условиях экспериментального лечения.

Обозначения: по оси абсцисс: I – контроль (интактные крысы), II – крысы со стрептозоточин-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/мм<sup>2</sup>; \* –  $P < 0,05$  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. Патофизиологические 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 стрептозоточин-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.