

УДК 617.735–002–02:616.379–008.64–092.9–085–07+577.11

Влияние рекомбинантного эритропоэтина на структурные изменения сетчатой оболочки, концентрацию гемоглобина и количество эритроцитов в периферической крови крыс на модели стрептозотоцинового диабета

Н. В. Пасечникова, член-корр. НАМН Украины, В. А. Науменко, д-р мед. наук, В. В. Вит, проф., Т. С. Пилькевич, аспирант

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

Актуальність. Останнім часом ведуться дослідження про роль еритропоетину в розвитку та прогресуванні діабетичної ретинопатії.

Метою цього дослідження є визначення впливу рекомбінантного ЕПО у тварин з стрептозотоциновим діабетом на структурні особливості сітківки, а також концентрацію гемоглобіну та кількість еритроцитів у периферичній крові.

Матеріал і методи. Експеримент проведений на 30 щурах породи Вістар. Цукровий діабет моделювали за допомогою одноразового внутрішньочеревного введення стрептозотоцину в дозі 65 мг на 1 кг ваги. Всі щури розподілялися на три групи, по десять щурів (20 очей) у кожній групі. I група — інтактні тварини, II група — тварини з модельованим діабетом, III група — тварини з модельованим діабетом, що отримували rЕПО. Введення rЕПО починалося на 10 добу в дозі 60 ОД на 1 кг маси тіла три рази на тиждень протягом двох тижнів.

Результати. У інтактних щурів, в периферичній крові та в скловидному тілі визначається еритропоетин. Введення тваринам III групи rЕПО призводить до достовірного підвищення концентрації ЕПО в периферичній крові та скловидному тілі, збільшенню кількості еритроцитів у периферичній крові та концентрації гемоглобіну. У тварин II групи відзначається розвиток набряку сітківки, вакуольна дегенерація гангліозних клітин сітківки, ознаки деструктивних змін стінок частини капілярів сітківки, а введення тваринам III групи rЕПО істотно знижує ймовірність цих змін.

Ключевые слова: стрептозотоциновый диабет, рекомбинантный эритропоэтин, диабетическая ретинопатия.

Ключові слова: стрептозотоциновий діабет, рекомбінантний еритропоетин, діабетична ретинопатія.

Effect of recombinant erythropoietin on structural changes of the retina, hemoglobin concentration and erythrocytes quantity in peripheral blood in streptozotocin-induced diabetic rats

Pasyechnikova NV, Naumenko VA, Vit VV, Pilkevich TS

SI «The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of NAMS of Ukraine», Odessa, Ukraine

Introduction. Recently the role of erythropoietin (Epo) in the development of diabetic retinopathy has been studied.

Purpose. To determine the effect of recombinant erythropoietin (rEpo) on structural peculiarities of the retina, hemoglobin concentration and erythrocyte quantity in peripheral blood in streptozotocin-induced diabetes animals.

Methods. 30 Vistar rats were included in the experiment. Diabetes was simulated using a single intraperitoneal injection of streptozotocin in a dose of 65 mg per 1 kg body weight. All rats were divided into three groups, each of 10 rats (20 eyes). Group 1 consisted of intact rats; group 2 — of streptozotocin-induced diabetes rats not receiving rEpo; group 3 — of streptozotocin-induced diabetes rats receiving rEpo. REpo administration started on the 10th day in a dose of 60 units per 1 kg of body weight three times a week during two weeks.

© Н. В. Пасечникова, В. А. Науменко, В. В. Вит, Т. С. Пилькевич, 2013

Results. Epo was detected in peripheral blood and vitreous of intact rats. Erythrocyte quantity and hemoglobin concentration in blood didn't change in rats of Group 2. REpo administration in Group 3 led to significant increase of Epo concentration in peripheral blood and vitreous, increase of erythrocyte quantity and hemoglobin concentration. Development of retinal edema, vacuolar degeneration of retinal ganglion cells, signs of destructive changes in the retinal capillaries walls were noted in animals of Group 2, and rEpo administration significantly reduced the risk of development of those complications in Group 3.

Key-words: streptozotocin-induced diabetes, recombinant erythropoietin, diabetic retinopathy.

Актуальность. По данным Всемирной организации здравоохранения, приблизительно 180 млн. людей во всем мире болеют сахарным диабетом (СД) [1, 3, 4]. По прогнозам к 2018 году эта цифра увеличится до 366 млн. Более быстрый рост заболеваемости предполагается в развивающихся странах, преобладая среди лиц трудоспособного возраста [2, 5]. Диабетическая ретинопатия (ДРП) относится к числу наиболее тяжелых сосудистых осложнений СД [6, 7]. Вместе с тем ДРП можно рассматривать не как осложнение, а как естественный результат развития патологических изменений в микрососудистой сети сетчатки у больных СД [8, 9].

В последнее время ведется изучение роли эритропоэтина (ЭПО) в развитии и прогрессировании диабетической ретинопатии. Однако единого мнения по этому поводу до сих пор не существует. По мнению некоторых авторов, повышенная продукция ЭПО во внутриглазной жидкости у пациентов с диабетом и наличием диабетической ретинопатии имеет защитный характер за счет мощного антиоксидантного и нейропротекторного эффектов, а также противоишемического действия [11]. Но есть и другие данные, свидетельствующие о том, что ЭПО может являться индуктором ангиогенеза и тем самым ухудшать течение диабетической ретинопатии [12]. В литературе приведены сведения относительно того, что существуют функциональные рецепторы к эритропоэтину не только на мембранах клеток красного ростка костного мозга, но и на нейронах [13].

Несмотря на многочисленные исследования, проводимые в последнее время, данных относительно наличия и концентрации эритропоэтина в стекловидном теле, а также возможного его влияния на течение экспериментального диабета у крыс породы Вистар в литературе не имеется.

Благодаря изученному опосредованному противоишемическому действию эритропоэтина на ткани организма можно предположить, что эритропоэтин может снизить скорость прогрессирования диабетической ретинопатии.

Целью настоящего исследования является определение влияния рекомбинантного ЭПО у животных со стрептозотоциновым диабетом на структурные особенности сетчатой оболочки, а также концентрацию гемоглобина и количество эритроцитов в периферической крови.

Материал и методы

Экспериментальное исследование проведено на 60 глазах (30 крыс), породы Вистар, массой 181,8–207,0 г. До проведения опыта животные выдерживались в карантине в течение двух недель. Содержались животные в стандартных условиях вивария, на стандартном водном и питьевом режимах. Эксперимент проводили с выполнением этических норм, предусмотренных международными принципами Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и в других научных целях» (Страсбург, 1985) и норм биомедицинской этики, одобренных Первым Национальным конгрессом Украины по биоэтике (2001), а также Закона Украины № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Киев, 2006).

Все животные были распределены по следующим группам: первая группа — интактные животные, вторая — животные с моделированным сахарным диабетом, третья группа — животные, с моделированным сахарным диабетом, получавшие рекомбинантный эритропоэтин (рЭПО). Каждая группа состояла из 10 животных.

Сахарный диабет у крыс моделировали однократным введением внутрибрюшинно стрептозотоцина (SIGMA, США) в дозе 65 мг на 1 кг массы тела. Первые симптомы сахарного диабета появлялись через трое суток после введения стрептозотоцина у всех крыс второй и третьей групп. Отмечалось повышение уровня сахара крови в среднем до 10,0 ммоль/л, а также увеличение приема воды при постоянном увеличении диуреза.

Начиная с десятых суток (период стабильной гипергликемии) [10] крысам третьей группы вводили подкожно рЭПО 3 раза в неделю по 60 ЕД на 1 кг массы тела в течение двух недель.

Животных выводили из эксперимента через две недели от начала эксперимента декапитацией под эфирным наркозом, после чего в минимальный срок проводили забор 5 мл крови и энуклеацию глаз. Выведение экспериментальных животных проводилось одновременно.

Глазные яблоки животных фиксировали в 10 % растворе формалина в течение 24–48 часов, после чего выполняли стандартную методику обработки материала (заключение материала в парафин, окрашивание срезов гематоксилином и эозином). Гистоморфологические исследования проводились на базе лаборатории патоморфологии и электронной микроскопии с использованием микроскопа Jenamed 2.

Уровень эритропоэтина в плазме крови и стекловидном теле определялся с помощью иммуноферментного анализа. Для этого использовались планшеты для количественного измерения эритропоэтина в сыворотке, плазме и других биологических жидкостях крыс (E90028 Ra 96 Tests Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit for Erythropoetin, производства США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием статистической программы Statistica 9.0.

Для анализа различий количественных показателей в сравниваемых группах использовали параметрический дисперсионный анализ (ANOVA) с предварительной оценкой нормальности распределения по критерию Шапиро-Уилкса. После проведения дисперсионного анализа использовали критерий множественного сравнения Ньюмана-Кейлса.

Результаты исследования

Проведенное исследование выявило, что у интактных крыс в периферической крови и стекловидном теле определяется эритропоэтин в концентрации (26,2±1,4) пг/мл и (331,6±21,8) пг/мл соответственно.

При исследовании уровня эритропоэтина у крыс со стрептозотоциновым диабетом обнаружено отсутствие достоверного изменения его концентрации в периферической крови (p=0,07) и достоверное повышение его уровня в стекловидном теле (p=0,001) (табл. 1, 2).

Анализ уровня эритропоэтина у крыс со стрептозотоциновым диабетом, которым вводили рекомбинантный ЭПО, выявил достоверное увеличение его уровня как в периферической крови, так и в стекловидном теле по сравнению с показателями первой и второй экспериментальных групп (p=0,0001).

Уровень гемоглобина у интактных животных составил в среднем 148,0 г/л, а количество эритроцитов в периферической крови в среднем $7,0 \times 10^{12}/л$. При исследовании этих показателей у крыс второй группы установлено, что показатели уровня гемоглобина и количества эритроцитов в периферической крови достоверно не отличались по сравнению с интактными животными — 169,4 г/л и $6,8 \times 10^{12}/л$ соответственно. У животных третьей группы мы выявили достоверное повышение гемоглобина 249,2 г/л и количества эритроцитов в периферической крови $8,4 \times 10^{12}/л$.

При проведении морфологических исследований сетчатки у крыс первой группы ее структурных изменений не выявлено. При морфологиче-

ском исследовании сетчатки крыс второй группы у 8 животных из 10 мы выявили: фокальный отек внутреннего плексиформного слоя, неравномерное распределение ганглиозных клеток, а также фокальное уменьшение их количества. Как видно из рисунка 1, происходит изменение формы и размера ядер клеток. Кроме ядер небольшого размера и круглой формы видны ядра значительно большего размера и неправильной формы, а также изменяются их тинкториальные свойства. В некоторых ядрах отмечается диффузное распределение гетерохроматина. Часть ганглиозных клеток подвергается пикнозу, при этом ядра уменьшаются в размерах и становятся гиперхромными.

Выявлены структурные изменения сетчатой оболочки, которые проявляются неравномерным распределением ганглиозных клеток с участками их отсутствия. В местах отсутствия ганглиозных клеток отмечается истончение слоя нервных волокон, а на остальном протяжении слой нервных волокон отечен и имеет сетчатый вид. В местах наиболее выраженных дегенеративных изменений ганглиозных клеток выявляется разрушение внутренней пограничной мембраны (рис. 2). Каких-либо существенных изменений в остальных слоях сетчатой оболочки (внутренний и наружный ядерные слои, плексиформные слои, слой фоторецепторов) не обнаруживается.

Обращает на себя внимание наличие определенных изменений сосудистой системы, расположенной во внутренних слоях сетчатки, проявляющихся дегенерацией эндотелиальной выстилки капиллярных сосудов (рис. 3). Также определяются небольшие глиальные пролифераты вблизи сосудов с признаками деструкции сосудистой стенки. Местами отмечается разрушение стенки сосудов. У двух животных из десяти каких-либо выраженных изменений сетчатой оболочки не обнаружено.

При исследовании структурных изменений сетчатой оболочки у крыс со стрептозотоциновым диабетом, которые получали рекомбинантный ЭПО,

Таблица 1. Концентрация ЭПО в крови крыс спустя две недели после моделирования сахарного диабета

Группа	Уровень ЭПО в крови (пг/мл) M±m	SD	Медиана	p
Интактные животные (n=10)	26,2±1,4	4,3	26,0	p ₁₋₂ =0,07 p ₁₋₃ =0,0001 p ₂₋₃ =0,0001
Моделированный сахарный диабет (n=10)	36,2±2,9	9,4	32,8	
Моделированный сахарный диабет + рЭПО (n=10)	77,1±5,6	17,8	71,8	

Таблица 2. Уровень ЭПО в стекловидном теле у крыс с длительностью сахарного диабета две недели

Группа	Уровень ЭПО в стекловидном теле (пг/мл) M±m	SD	Медиана	p
Интактные животные (n=7)	331,6±21,8	57,7	325,2	p ₁₋₂ =0,001 p ₁₋₃ =0,0001 p ₂₋₃ =0,0246
Моделированный сахарный диабет (n=7)	431,5±14,1	37,2	442,2	
Моделированный сахарный диабет + рЭПО (n=7)	497,8±20,5	54,2	487,2	

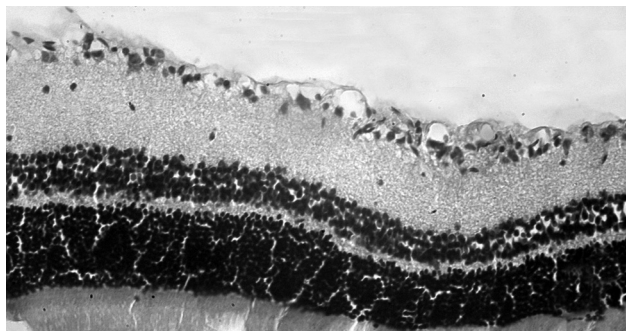


Рис. 1. Структурные особенности сетчатой оболочки крысы спустя две недели после моделирования стрептозотоцинового диабета. Отмечается выраженная вакуольная дегенерация части ганглиозных клеток, сопровождающаяся пикнозом ядер. Дезорганизация слоя нервных волокон. Отслоение внутренней пограничной мембраны. Гематоксилин-эозин. X 200

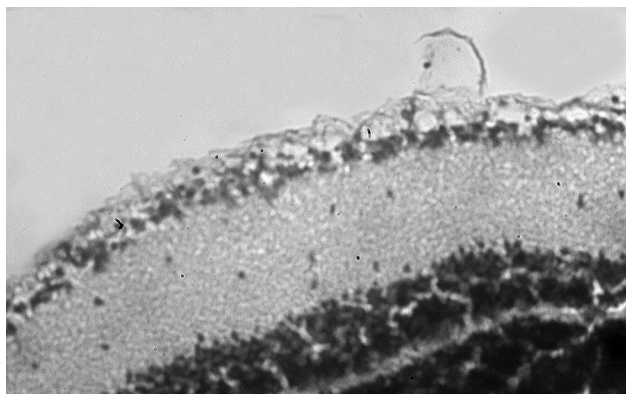


Рис. 2. Структурные особенности сетчатой оболочки крысы спустя две недели после моделирования стрептозотоцинового диабета. Существенное истончение слоя нервных волокон. Пикноз ядер ганглиозных клеток и отслоение внутренней пограничной мембраны. Гематоксилин-эозин. X 200

только у двух животных из 10 выявлены изменения сетчатой оболочки, а именно: явления отека внутренних слоев сетчатой оболочки средней степени выраженности, в частности слоя нервных волокон. Часть ганглиозных клеток находится в состоянии вакуольной дегенерации, при этом клетки увеличены в размерах, ядра пузырьковидные и светлые. Отмечается неравномерное распределение ганглиозных клеток. Строение кровеносных сосудов, расположенных во внутренних слоях сетчатки, без существенных структурных изменений. У остальных 8 животных каких-либо выраженных изменений строения сетчатой оболочки не обнаружено (рис. 4).

Выводы

1. У крыс породы Вистар в периферической крови и в стекловидном теле определяется эритропоэтин в концентрации (26,2±1,4) пг/мл и (331,6±21,8) пг/мл соответственно.

2. Введение животным с моделированным стрептозотоциновым диабетом подкожно рекомбинантного ЭПО в дозе 60 ЕД/кг массы тела 3 раза в неделю на протяжении двух недель приводит к достоверному повышению концентрации ЭПО в периферической крови до 77,1 ±5,6 и стекловидном теле до 497,8±20,5.

3. При воспроизведении стрептозотоцинового диабета у крыс (в течение двух недель) не изменяются количество эритроцитов и концентрация гемоглобина в периферической крови, а введение подкожно рекомбинантного ЭПО, в дозе 60 ЕД/кг массы тела 3 раза в неделю, приводит к увеличению количества эритроцитов и концентрации гемоглобина в периферической крови на 20 % и 68 % соответственно.

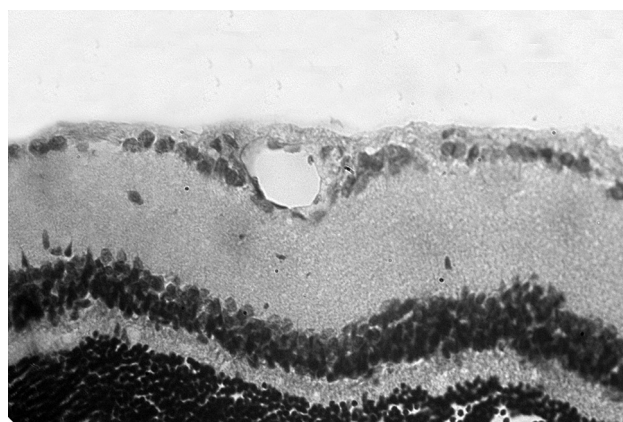


Рис. 3. Структурные особенности сетчатой оболочки крысы спустя две недели после моделирования стрептозотоцинового диабета. Существенное истончение слоя нервных волокон и отек сохранившихся ганглиозных клеток. Отмечается набухание эндотелиальных клеток сосуда, расположенного в слое нервных волокон и фокальная деструкция его стенки. Гематоксилин-эозин. X 200

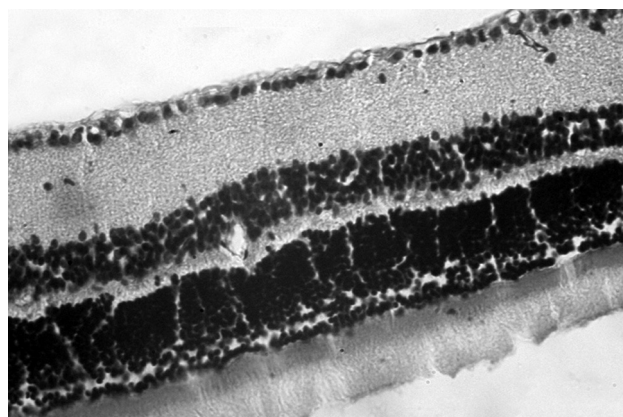


Рис. 4. Структурные особенности сетчатой оболочки крысы спустя две недели после моделирования стрептозотоцинового диабета и введения рекомбинантного эритропоэтина. Отмечается равномерное распределение ганглиозных клеток без признаков вакуольной дегенерации. Незначительный отек слоя нервных волокон. Гематоксилин-эозин. X 200

4. У животных с моделированным стрептозотоциновым диабетом в 80 % случаев развивается отек сетчатой оболочки, вакуольная дегенерация ганглиозных клеток, признаки деструктивных изменений стенок части капилляров сетчатки.

5. Введение животным с воспроизведенным стрептозотоциновым диабетом рЭПО в течение двух недель приводит к снижению как частоты развития (20 %), так и степени повреждения сетчатой оболочки.

Литература

1. Чумаева Е. А. Офтальмологические последствия сахарного диабета: социально-гигиенические и клинические аспекты / Е. А. Чумаева // Вестник офтальмологии. — 2003. — № 5. — С. 43–44.
2. Балаболкин М. И. Диабетология / М. И. Балаболкин М. И. //— М.: Медицина, 2000. — 672 с.
3. Старенька И. Лікування цукрового діабету: реальність і перспективи/ И. Старенька // Здоров'я України. — 2004. — № 3. — С. 24.
4. Нестеров А. П. Диабетическая ретинопатия / А. П. Нестеров // Русский международный журнал. — 2000. — № 1. — С. 3–8.
5. Ловля Г. Д. Частота і фактори ризику діабетичної ретинопатії при цукровому діабеті 1 типу / Г. Д. Ловля, О. Д. Рудковська, Н. М. Голубовська, В. І. Паньків // Тезиси симпозиума. — Одесса, 2001. — С. 173–174.
6. Мошетова Л. К. Этиологическая многофакторность диабетической ангиопатии / Л. К. Мошетова, Э. П. Касаткина, Г. Ш. Сабурова, Э. А. Очирова, А. В. Бородай, А. М. Пластинина // Офтальмохирургия. — 2000. — № 4. — С. 72–75.
7. Семенов А. Д. Слепота у больных диабетом: медицинские и социальные аспекты проблемы / А. Д., Семенов, В. М. Малов, С. Л. Бранчевский // Офтальмохирургия. — 1998. — № 4. — С. 33–37.
8. Тронько Н. Д. По материалам 42-го конгресса Европейской ассоциации по изучению сахарного диабета / Н. Д. Тронько, В. Л. Орленко // Здоров'я України. — 2006. — № 21. — С. 210–241.
9. Нестеров А. П. Диабетическая ретинопатия / А. П. Нестеров // Русский международный журнал. — 2000. — № 1. — С. 3–8.
10. Колесник Ю. М. Модифікація резистентності до діабетогенних факторів під впливом хронічного стресу та адаптації до періодичної гіпоксії / Ю. М. Колесник, М. О. Орловский, М. А. Калініченко, Т. А. Грекова // Запорож. мед. журн. — 2005. — № 3. — С. 21–26.
11. Katsura Y. Erythropoietin Is Highly Elevated in Vitreous Fluid of Patients With Proliferative Diabetic Retinopathy / Y. Katsura, T. Okano, K. Matsuno [et al.] // Diabetes Care. — 2005. — Vol. 28, № 9. — P. 2252–2254.
12. Wang Z. Y. Erythropoietin therapy for early diabetic retinopathy through its protective effects on retinal pericytes / Z. Y. Wang, K. K. Zhao, P. Q. Zhao // Med. Hypotheses. — 2011. — Vol. 76, № 2. — P. 266–268.
13. Buemi M. Erythropoietin and the brain: from neurodevelopment to neuroprotection / M. Buemi, E. Cavallaro, F. Floccari, et al. // Clinical. Science. — 2002. — Vol. 103. — P. 275–282.

Поступила 07.11.2013

References

1. Chumayeva YeA. Ophthalmic consequences of diabetes: socio-sanitary and clinical aspects. Vestn Oftalmol. 2003; 5: 43–4. Russian.
2. Balabolkin MI. Diabetology. M.: Meditsina; 2000. 672 p.
3. Starenka I. Treatment for diabetes: reality and prospects. Zdorovya Ukrainy. 2004; 3:24. Ukrainian.
4. Nesterov AP. Diabetic retinopathy. Russkii mezhdunarodnyi zhurnal. 2000; 1: 3–8. Russian.
5. Lovlya GD, Rudkovska OD, Golubovska NM, Pan'kiv VI. Frequency and risk factors of diabetic retinopathy in type 1 diabetes. Theses of symposia. Odessa, 2001: 173–4. Ukrainian.
6. Moshetova LK, Kasatkina EP, Saburova GSh, Ochirova EA, Borodai AV, Plastinina AM. Multifactorial etiology of diabetic angiopathy. Oftalmokhirurgiiia. 2000; 4: 72–5. Russian.
7. Semenov AD, Malov VM, Branchevskii SL. Blindness in diabetic patients: medical and social aspects of the problem. Oftalmokhirurgiiia. 1998; 4: 33–7. Russian.
8. Tronko ND, Orlenko VL. Proceedings of the 42nd Congress of the European Association for the Study of Diabetes. 2006; 21: 210–41.
9. Nesterov AP. Diabetic retinopathy. . Russkii mezhdunarodnyi zhurnal. 2000; 1: 3–8. Russian.
10. Kolesnik YuM, Orlovskii MO, Kalinichenko MA, Grekova TA. Modification of resistance to diabetic factors under the influence of chronic stress and adaptation to periodic hypoxia. Zaporozh Med Zhurn. 2005; 3: 21–6. Ukrainian.
11. Katsura Y, Okano T, Matsuno K et al. Erythropoietin Is Highly Elevated in Vitreous Fluid of Patients With Proliferative Diabetic Retinopathy. Diabetes Care. 2005; 28(9): 2252–4.
12. Wang ZY, Zhao KK, Zhao PQ. Erythropoietin therapy for early diabetic retinopathy through its protective effects on retinal pericytes. Med. Hypotheses. 2011; 76(2): 266–8.
13. Buemi M, Cavallaro E, Floccari F et al. Erythropoietin and the brain: from neurodevelopment to neuroprotection. Clinical. Science. 2002; 103: 275–82.

Received 07.11.2013