

Модулирующее воздействие макрофагов на восстановление структурных изменений сосудистой оболочки глаза при экспериментальном сахарном диабете

Данилова И.Г., д.б.н., Медведева С.Ю., к.м.н., Булавинцева Т.А., очный аспирант, Гетте И.Ф., к.б.н. Лаборатория морфологии и биохимии, Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург; Смирных С.Е., Уральский Государственный университет им.А.М.Горького, г. Екатеринбург; Черешнева М.В., г.н.с. Лаборатория иммунофизиологии, Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург; Абидов М.Т., профессор Институт Иммунопатологии РАЕН, г. Москва

The modulating influence of macrophages on recovery of structural changes of vascular tunic of eye in experimental diabetes

Danilova I.G., Medvedeva S.J., Bulavinceva T.S., Gette I.F., Smirnyh S.E., Chereshneva M.V., Abidov M.T.

Резюме

В результате экспериментального исследования было установлено, что в условиях диабетической ретинопатии макрофаги определяют характер и выраженность воспалительного процесса пигментной и сосудистой оболочки глаза. Модуляция их функциональной активности препаратом «Тамерит» способствовала восстановлению популяции и функционирования меланоцитов пигментного слоя, стимуляции ангиогенеза в сосудистой оболочке глаза и обратному развитию склеротических изменений.

Ключевые слова: диабетическая ретинопатия, макрофаг, меланоцит, сосудистая оболочка глаза, коррекция

Summary

We showed that macrophages regulate a character and degree of inflammatory process in pigmented layer and vascular tunic of eye in diabetic retinitis. Meanwhile, the modulation of their functional activity by the preparation «Tamerite» have resulted in regeneration of quantity and their functioning of melanocyte of pigment tunic and stimulation of angiogenesis vascular tunic of eye.

Keywords: diabetic retinitis, macrophage, melanocyte, correction, vascular tunic of eye

Введение

Диабетическая ретинопатия (ДРП) – распространенное сосудистое осложнение сахарного диабета (СД) – занимает лидирующее место среди причин слепоты и ухудшения зрения работоспособного населения развитых стран. По данным разных авторов ДРП обнаруживается у 25-95% больных СД, 10% из которых становятся инвалидами по зрению [1]. Возникновение ретинопатии при СД связано с нарушением гемато-ретиального барьера глазного яблока. Апоптоз, некроз перицитов и эндотелиоцитов хориокапилляров, происходящие вследствие гликозилирования мембранных белков и накопления токсических продуктов перекисного окисления липидов, способствуют разрушению сосудистой оболочки глаза. Окклюзия капилляров сетчатки приводит к отеку и развитию воспалительной реакции [1,2].

Известно, что воспаление играет ключевую роль в патогенезе развития ДРП. Миграция лейкоцитов и выраженный лейкодиapedез всегда предваряют расслоение и отслойку сетчатки с последующим замещением ее рубцовой тканью [3,4]. При этом воспаление является с одной стороны потенциальным фактором, усиливающим тяжесть течения заболевания, а с другой – ограничивает степень поражения сетчатки глаза. В настоящее время установлено, что пигментный слой сетчатки, являющийся составной частью гемато-ретиального барьера, выполняет многочисленные функции, предохраняя сетчатку от поражения. К ним относятся транспорт метаболитов, адсорбция свободных радикалов, реинтерализация ретинола, фагоцитоз токсических веществ, секреция факторов роста, поддерживающих структурную целостность сетчатой оболочки глаза [5,6,7,8]. Обладая морфофункциональными свойствами фагоцитов и занимая положение в местах возможного контакта с различными гуморальными факторами и антигенами, меланоциты пигментного эпителия исполняют роль резидентных макрофагов. Известно, что макрофаги в зависимости от функций и типа активации могут усиливать как воспаление, так и регенерацию [9]. Секретируя различные противо-

Ответственный за ведение переписки -

Данилова Ирина Георгиевна

620066 Екатеринбург, ул. Первомайская, 106

Ig_danilova@yandex.ru

воспалительные цитокины, ростовые факторы, биологически активные вещества, макрофаги способны активировать восстановительный рост тканей вне зависимости от вида ткани и типа поражения, регулируя скорость деления и дифференцировки клеток. Следовательно, целенаправленное воздействие на систему фагоцитирующих мононуклеаров может использоваться для лечения различных заболеваний [10,11,12]. Однако, несмотря на многочисленные исследования, остаются нераскрытыми вопросы, связанные с ролью макрофагов пигментной оболочки глаза в развитии ДРП. Вместе с тем, выяснение возможного влияния макрофагов в патогенезе ДРП позволило бы найти новые патогенетические подходы к разработке методов стимуляции и регенерации тканей глаза при их поражении.

Целью настоящей работы является изучение роли меланоцитов сосудистой оболочки глаза в возникновении диабетической ретинопатии у крыс и возможности коррекции патологических изменений в условиях модулирования активности макрофагов.

Материалы и методы

Опыты выполнены на 45 беспородных крысах-самцах массой 160-180г, содержащихся на обычном рационе вивария. В настоящее время распространенной классической экспериментальной моделью для изучения патогенеза инсулинозависимого сахарного диабета остаются модели с введением аллоксана [2]. Аллоксан (уреид мезоксалево́й кислоты) может синтезироваться в организме из мочево́й кислоты при гиперурикемии. Этот диабетоген вызывает избирательное токсическое поражение β -клеток островков поджелудочной железы, запуская аутоиммунный процесс, который сопровождается воспалением и приводит к их уничтожению [13,14,15,16].

Известные в литературе модели аллоксанового диабета позволяют создавать выраженные изменения, характерные для некомпенсированного инсулинозависимого сахарного диабета, сопровождающегося повышением содержания глюкозы в крови до 14-16 ммоль/л и выше. Однако однократное введение больших доз аллоксана сопровождается значительной летальностью животных (до 30% и выше). Это объясняется резкой гибелью β -клеток островков и развивающейся на этом фоне острой гипергликемии.

Для проведения экспериментальных работ с хроническими воздействиями нами была разработана новая модификация экспериментальной модели аллоксанового диабета [17]. Животным натошак трехкратно внутрибрюшинно вводили аллоксан, растворенный в физиологическом растворе, в количестве 10мг/100г веса с интервалом в 2 дня. Такой способ введения аллоксана способствовал уменьшению его токсического действия, постепенному развитию аутоиммунного процесса и обеспечивал 100% выживаемость экспериментальных животных. В период развития аллоксанового диабета у крыс в динамике определяли массу тела и содержание глюкозы в периферической крови. Через три недели после последнего введения аллоксана развивался экспериментальный

аллоксановый диабет, сопровождавшийся полидипсией, полиурией, повышением уровня глюкозы и гликозилированного гемоглобина в крови. Модуляцию активности макрофагов проводили отечественным препаратом «Тамерит» (3-аминофталгидразид, утвержден Госфармкомитетом РФ 03.04.00.), иммуномодулирующие свойства которого проявляются в восстановлении нормальной антигенпрезентирующей и секреторной функции клеток моноцитарно-макрофагального ряда [18].

Все экспериментальные животные были разделены на 3 группы:

- 1 группа – интактные здоровые животные;
- 2 группа – контрольные животные с декомпенсированным аллоксановым диабетом;
- 3 группа – опытные животные с декомпенсированным сахарным диабетом, которым производили воздействие на макрофаги путем внутримышечного введения препарата «Тамерит» (2мг/кг, 20 инъекций по схеме).

Контрольной группе животных по той же схеме вводили физиологический раствор.

У животных всех групп измеряли массу тела, определяли общее количество эритроцитов, лейкоцитов и подсчитывали лейкоцитарную формулу в периферической крови из хвостовой вены. Подсчет эритроцитов и лейкоцитарной формулы выполнен на гематологическом анализаторе «Cell-Дуп - 3500R» фирмы «Abbot diagnostic» (США).

В плазме крови животных определяли содержание глюкозы глюкоксидазным методом по стандартному набору реактивов фирмы «Витал Диагностикс» (СПб), а в цельной крови – содержание гликозилированного гемоглобина методом гель-хроматографии по готовому набору реактивов «Диабет-тест» фирмы ФОСФОСОРБ. Биохимические исследования выполнены на полуавтоматическом фотометре «Сотмай Плюс».

Иммуноферментные методы анализа использовали для определения содержания инсулина, инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1), кортикостерона в плазме крови животных всех групп с использованием соответствующих наборов.

Подготовку образцов тканей глаза для гистологического исследования осуществляли на автоматическом процессоре Leica EG 1160 с последующей заливкой в парафин. Срезы толщиной 3-5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином, пирюфуксином по Ван-Гизону и Вейгерту. При проведении микроскопического исследования (на микроскопе Leica DM 2500) оценивались структурные изменения сосудистой оболочки глаза, морфо-метрические исследования с определением количества пигментных клеток и количества сосудов на единицу площади производили с использованием программы анализа изображений Видео-Тест «Морфология» 5.0.

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью программного пакета Microsoft Excel 7.0 для операционной системы Windows 2007, с целью установления достоверных отличий был использован Т-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В крови животных с аллоксановым диабетом (группа 2) содержание глюкозы в крови увеличивалось почти в 5 раз относительно уровня этого показателя у интактных животных. Изменение уровня гликозилированного гемоглобина в группе 2 соответствовало изменению содержания глюкозы (таблица 1). Динамика основных показателей сахарного диабета в группах подтверждает правильность выбранной методики формирования аллоксанового диабета. По содержанию глюкозы и гликозилированного гемоглобина в крови состояние животных согласно современной классификации тяжести состояния при сахарном диабете можно оценить как декомпенсированное [1].

На фоне лечения препаратом «Тамерит» уровень глюкозы достоверно снижается в среднем на 38,5% по сравнению с контрольными животными, при этом оставаясь значительно выше этого показателя у интактных здоровых крыс. Необходимо отметить, что содержание Hb A1c, уровень, которого является наиболее объективным показателем течения сахарного диабета, полностью нормализуется у животных опытной группы. На фоне модуляции макрофагов также происходит восстановление гормонального фона – содержание инсулина крови возрастает, а кортикостерона уменьшается до уровня интактных животных (таблица 1). Данный факт свидетельствует о торможении процесса глюконеогенеза и повышении утилизации глюкозы тканями. Соотношение инсулиноподобных факторов роста также возвращается к физиологической норме, что, по-видимому, отражается и на уровне глюкозы в крови.

Гистологическое исследование сосудистой оболочки глаза в группе экспериментальных животных с аллоксановым сахарным диабетом показало структурные нарушения в сосудах микроциркуляции, которое сопровождалось десквамацией клеток эндотелия. В части сосудов определялось набухание клеток эндотелия, что приводило либо к окклюзии сосудов, либо к развитию интерстициального отека. Это свидетельствует о структурных нарушениях гемато-ретиального барьера, характерных для диабетической ретинопатии. Данные изменения сопровождалась дистрофией пигментного эпителия сосудистой оболочки и сетчатки, в большинстве случаев до полного исчезновения пигментных клеток (Рис. 1А,Б - см. на цветных страницах).

При гистологическом исследовании структур глаза экспериментальных животных в условиях модуляции активности макрофагов отмечалось восстановление пигментного эпителия сетчатки и сосудистой оболочки, определились очаги ангиогенеза с образованием сосудов капиллярного типа (Рис 1В,Г).

Морфометрическое исследование сосудистой оболочки глаз экспериментальных животных с аллоксановым диабетом показало достоверное снижение количества кровеносных сосудов на единицу площади, а содержание пигментных клеток равнялось нулю. В группе экспериментальных животных на фоне лечения число кровеносных сосудов и пигментных клеток на единицу площади увеличивалось и соответствовало уровню интактных животных. (Рис. 2,3).

Морфометрическое исследование сосудистой оболочки глаз экспериментальных животных с аллоксановым диабетом показало достоверное снижение количества кровеносных сосудов на единицу площади, а содержание пигментных клеток равнялось нулю. В группе экспериментальных животных на фоне лечения число кровеносных сосудов и пигментных клеток на единицу площади увеличивалось и соответствовало уровню интактных животных. (Рис. 2,3).

Выводы

Таким образом, на основании проведенных исследований можно заключить, что макрофаги являются клетками, регулирующими процессы гомеостаза тканей глаза. В условиях диабетической ретинопатии эти клетки определяют характер и выраженность воспалительного процесса и последующих за ними процессов регенерации пигментной и сосудистой оболочки глаза. Модуляция ма-

Таблица 1. Содержание глюкозы и гликозилированного гемоглобина при аллоксановом диабете и на фоне лечения препаратом «Тамерит»

Показатель	1 Интактные	2 Аллоксановый диабет	3 Аллоксановый диабет + лечение препаратом «Тамерит»
Глюкоза, ммоль/л	5,9±0,3	27,8±3,5 *	17,0±3,0 *, **
Гликозилированный Гемоглобин (Hb A1c), %	5,1±0,2	9,6±0,3 *	4,1±0,9 **
Инсулин, мкг/л	1,21±0,20	0,45±0,09 *	2,53±0,64 **
Соотношение ИФР-1/ ИФР2	24,02±3,93	5,95±1,04*	16,2±2,46 **
Кортикостерон, пг/мл	36430±8860	65026±8600*	40034±11400

* - различия с группой интактных достоверны при $P < 0,05$;

** - различия с группой животных с сахарным диабетом достоверны при $P < 0,05$;

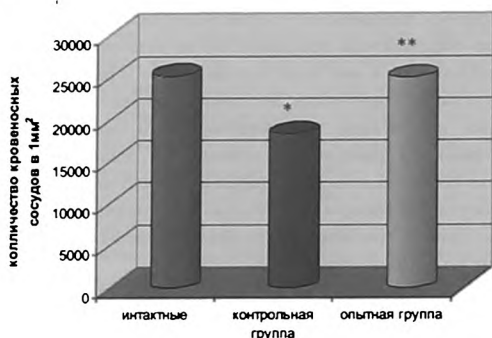


Рис. 2. Состояние микроциркуляции сосудистой оболочки глаза животных экспериментальных групп.

* - различия с группой интактных животных достоверны ($P < 0.05$), ** - достоверные различия с контрольной группой животных ($P < 0.05$)

крофагальной активности препаратом «Тамерит» приводит к восстановлению популяции и функциональной активности меланоцитов пигментной оболочки глаза. В результате у леченных животных склеротические изменения в строме сосудистой оболочки претерпевали обратное развитие. Улучшалась микровакуляризация за счет новообразованных сосудов.

С другой стороны активация макрофагов способствует повышению уровня инсулина, нормализации соотношения инсулиноподобных факторов роста, обладающих подавляемой инсулиноподобной активностью.

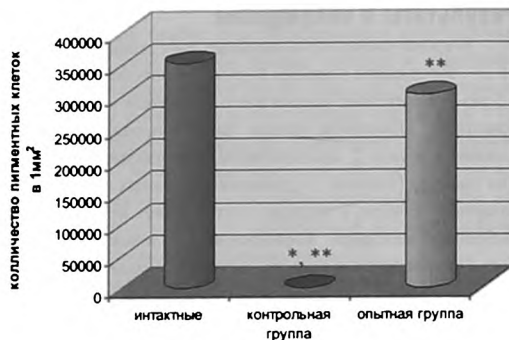


Рис. 3. Плотность распределения пигментных клеток в сосудистой оболочке глаза животных экспериментальных групп. * - достоверные различия с группой интактных животных ($P < 0.05$), ** - достоверные различия с контрольной группой животных ($P < 0.05$)

Вследствие нормализации гормонального фона у леченных крыс отмечается снижение уровня гликемии и гликозилированного гемоглобина. Таким образом, создаются условия для уменьшения уровня гликозилирования мембран и восстановления структурной целостности сосудистой стенки. Выделяя различные регуляторные факторы роста, в том числе исследованный в данной работе инсулиноподобный фактор роста, макрофаги оказывают также регуляторное влияние на дифференциацию и функциональную активность других клеточных популяций, способствуя ангиогенезу в сосудистой оболочке глаза. ■

Литература:

1. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Креминская В.М. Лечение сахарного диабета и его осложнений (руководство для врачей). М., Медицина - 2005. - 512 с.
2. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Патофизиология. - Т. 2. - Основы патохимии. - Санкт-Петербург. Элби-СПб. - 2001. - 687 с.
3. Jousseaume AM, Poulaki V, Le ML, et al. A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. FASEB J. 2004 Sep;18(12):1450-2.
4. Chibber R, Ben-Mahmud BM, Chibber S, Kohner EM. Leukocytes in diabetic retinopathy. FASEB J. 2004 Sep;18(12):1450-2.
5. Simy R, Carrasco E, Garcna-Ramirez M, Hernandez C. Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. Curr Diabetes Rev. 2006 Feb;2(1):71-98.
6. Simy R, Villarreal M, Corraliza L, Hernandez C, Garcia-Ramirez M. The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier--implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. J Biomed Biotechnol. 2010;190724.
7. Ben-Mahmud BM, Mann GE, Datti A, Orlacchio A, Kohner EM, Chibber R. Tumor necrosis factor-alpha in diabetic plasma increases the activity of core 2 GlcNAc-T and adherence of human leukocytes to retinal endothelial cells: significance of core 2 GlcNAc-T in diabetic retinopathy. Diabetes. 2004 Nov;53(11):2968-76.
8. Zhang SX, Wang JJ, Dashti A, et al. Macrophage migration inhibitory factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. Br J Ophthalmol. 2000 Jun;84(6):636-9.
9. Ranke MB. Insulin-like growth factor-I treatment of growth disorders, diabetes mellitus and insulin resistance. Trends Endocrinol. Metab. 2005, 16(4):190-197
10. Данилова И.Г., Гетте И.Ф., Абидов М.Т., Л.П.Кисельникова, Б.Г.Юшков, С.Ю.Медведева, И.А. Госьков Эндогенная интоксикация при экспериментальном пародонтите и иммунологические механизмы ее коррекции. Институт стоматологии (научно-практический журнал). 2005. № 4. 99-101.
11. Медведева С.Ю., Данилова И.Г., Юшков Б.Г., Сенцов В.Г., Абидов М.Т., Гетте И.Ф. Роль макрофагов в патогенезе токсического гепатита у крыс. Уральский медицинский журнал. 2010. №9 (74). 127-132.
12. Черешнев В.А., Юшков Б.Г., Абидов М.Т., Данилова И.Г., Храмова Ю.С. Морфогенетическая функция иммунокомпетентных клеток при восстановительных процессах в печени. Иммунология. 2004. Т.25. №4. 204-206.
13. Elsner M, Gurgul-Convey E, Lenzen S. Relative

- importance of cellular uptake and reactive oxygen species for the toxicity of alloxan and dialuric acid to insulin-producing cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2006, 41(5):825-834
14. Lenzen S. The mechanism of alloxan and streptozotocin induce diabetes. *Diabetologia.* 2008, 51(2): 216-226
 15. Szkudelsky T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in α -cells of rat pancreas. *Physiol. Res.* 2001, 50(6):537-546
 16. Walde SS, Dohle C, Schott-Ohly P, Gleichmann H. Molecular target structures in alloxan- induced diabetes in mice. *Life Sci.* 2002, 71 (14) : 1681-1694
 17. Данилова И.Г., Гетте И.Ф. Особенности моделирования аллоксанового сахарного диабета. Актуальные проблемы теоретической и прикладной биохимии. Российская конференция, посвященная 80-летию со дня рождения Р.И.Лифшица, приуроченная к 65-летию Челябинской государственной медицинской академии. 5-8 октября 2009г. ЧелГМА. Челябинск. С. 25-27
 18. Абидов М.Т. Иммунотропная активность тамерита. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2000. Т. 129 (приложение 3.)-112.

Патоморфология талк-ассоциированных изменений внутренних органов при интравенозной наркомании

Неволин А.Н., Гринберг Л.М., Кондрашов Д.Л.

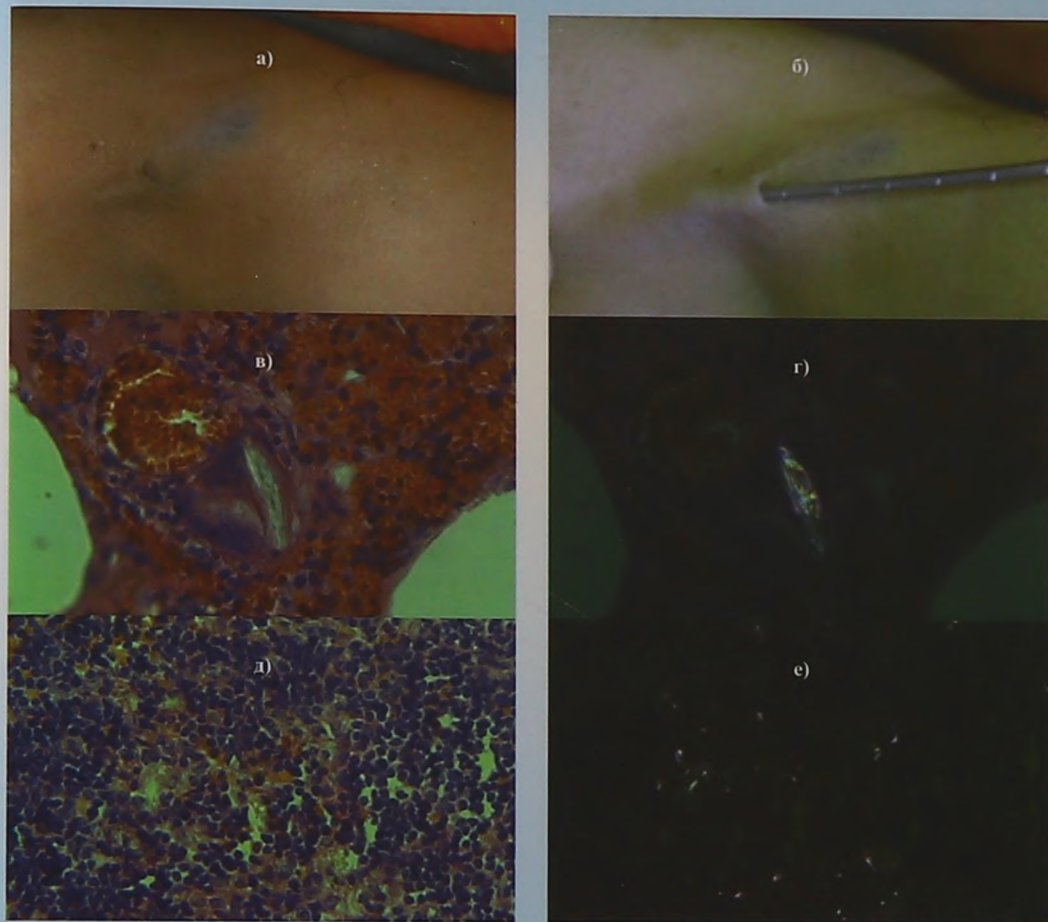


Рис.1. Изменения при интравенозной наркомании

А, Б – Макрофотография. Свищ в кубитальной области. В, Г – Крупный кристалл талька в интерстиции легких. Ув. X 400, В- окраска гематоксилин-эозин. Г – то же поле зрения. Поляризованный свет. Д, Е - Лимфоидная ткань селезенки. Ув. X400. Е – то же поле зрения. Мелкие тальк-содержащие кристаллы в поляризованном свете.

Модулирующее воздействие макрофагов на восстановление структурных изменений сосудистой оболочки глаза при экспериментальном сахарном диабете

Данилова И.Г.; Медведева С.Ю.; Булавинцева Т.А., Гетте И.Ф.; Смирных С.Е, Абидов М.Т., Черешнева М.В.

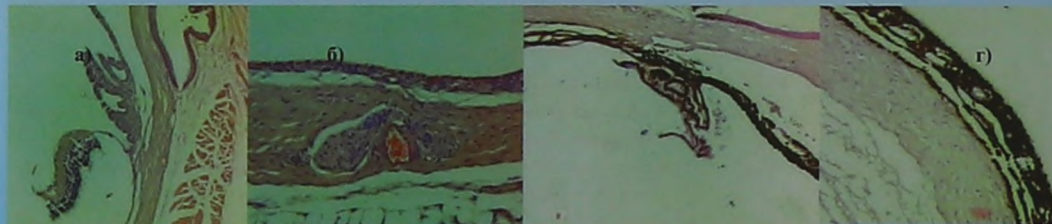


Рис. 1. Гистологические изменения. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение X 200.

А. Угол глаза в контрольной группе животных: дистрофия пигментного эпителия. Б. Сосудистая оболочка глаза в контрольной группе животных: дистрофия пигментного эпителия, десквамация и набухание клеток эндотелия, окклюзия сосудов. В. Угол глаза в опытной группе животных: восстановление пигментного эпителия сосудистой оболочки, радужки и цилиарного тела. Г. Сосудистая оболочка глаза опытной группы животных: восстановление пигментного эпителия и образование сосудов капиллярного типа. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение X 200