

М.Б. Щур¹
О.Я. Жураківська²

¹ Комунальне некомерційне підприємство Львівської обласної ради Львівська обласна клінічна лікарня
² Івано-Франківський національний медичний університет

Надійшла: 13.07.2019

Прийнята: 29.07.2019

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.3.170-175>

УДК: 611.813.1+616.379-008.64

МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЗОРОВОЇ КОРИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕН- ТАЛЬНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ

Shchur M.B. , Zhurakivska O.Ya.  ✉ Morphological characteristics of the visual cortex in experimental diabetes mellitus.

Lviv Regional Council Municipal Non-Profit Enterprise Lviv Regional Clinical Hospital, Lviv, Ukraine

Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, Ukraine

ABSTRACT. Background. The medical and social problem of diabetes mellitus (DM) is due to the significant prevalence, early disability and death of patients due to specific complications, one of which is diabetic encephalopathy. According to scientific literature, the latter is diagnosed in 80.7% of patients with type 1 diabetes. **Objective** of our work was to establish histo-ultrastructural changes in the visual cortex on the 56th day of the development of streptozotocin-induced diabetes mellitus (SSD). **Methods.** For the study, 10 sexually mature white male rats (body weight 160-180 g) were used, which were equally divided into 2 groups: the first was a research one with SDS (single intraperitoneal administration of streptozotocin (SIGMA Chemical USA) at a rate of 6 mg / 100 g weight body), the second - control. For morphometric studies, the NIH USA "Image J" software and the statistical package Stat.Soft.Inc were used; Tulsa, OK, USA; Statistica 10. **Results.** In animals with SJS, in contrast to the control group of rats, the number of vacuolated and pycnomorphic neurons increases against the background of a decrease in normochromic neurons by 0.01 mm² of the visual cortex. At the same time, the glial index increases by 1.8 times, and the number of capillaries by 0.01 mm² decreases by 2.2 times. At the ultrastructural level, the most pronounced changes are experienced by pycnomorphic neurons, which are localized in the inner pyramidal layer. In the outer pyramidal and inner granular layers of the visual cortex, neurons with partial necrosis are found. Such changes in the visual cortex occur against the background of the development of diabetic microangiopathy. Thus, on day 56 of the course of SJS in the visual cortex of rats, diabetic encephalopathy is diagnosed, which is morphologically manifested: an increase in the numerical density of pycnomorphic and vacuolated neurons due to a decrease in normochromic neurons; phenomena of satellite disease and neuronophagy; axonopathy in tangential bundles of nerve fibers of the neuropil. **Conclusion.** Such changes occur against the background of the development of diabetic microangiopathy, which is characterized by: erythrocyte sludge, platelet adhesion and microthrombi in the lumen of microvessels; an increase in the capillary wall area with a decrease in the area of their lumen; thickening of the basement membrane; pericapillary edema of the legs of astrocytes.

Key words: optic cortex, neuron, streptozotocin diabetes mellitus.

Citation:

Shchur MB, Zhurakivska OYa. [Morphological characteristics of the visual cortex in experimental diabetes mellitus]. Morphologia. 2019;13(3):170-5. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.3.170-175>

 Shchur M.B. 0000-0001-9661-7969

 Zhurakivska O.Ya. 0000-0002-1041-4237

✉ zhurakivska.o.ya@gmail.com

© SI «Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine», «Morphologia»

Вступ

Цукровий діабет (ЦД) посідає одне із перших місць як причина погіршення зору і сліпоти у людей віком 20–70 років [3]. Ризик розвитку сліпоти у хворих із ЦД в 25 раз вища, ніж у людей без ЦД [3]. Медико-соціальна проблема ЦД зумовлена значною поширеністю, ранньою інвалідністю і смертю хворих унаслідок специфічних ускладнень, одним із яких є

діабетична енцефалопатія. За даними наукової літератури діабетична енцефалопатія діагностується у 80,7% хворих із ЦД 1-го типу [4]. Науковими дослідженнями доведено, що ЦД у 2-6 рази підвищує ризик розвитку інсульту, в 2-3 рази транзиторних ішемічних станів, а в людей старшого віку сприяє розвитку хронічної недостатності мозкового кровообігу. Остання призводить до діабетичної енцефалопатії, що

супроводжується когнітивними порушеннями і судинною деменцією. Виявлений взаємозв'язок між ЦД 2-го типу і когнітивними функціями [2]. Так, у наукових дослідженнях показано більш низький рівень результатів когнітивних тестів у пацієнтів з ЦД 2-го типу, ніж здорових людей, що не залежали від віку, статі і освіти, і прискорення зниження когнітивних функцій у пацієнтів з ЦД [2]. Насамперед при ЦД страждають увага, швидкість обробки даних і пам'ять.

Тому метою нашої роботи було встановлення гістологічних та ультраструктурних змін зорової кори на 56 добу розвитку стрептозоточин індукованого ЦД.

Матеріали та методи

Для дослідження використано 10 статевозрілих білих щурів-самців (масою тіла 160-180 г), які порівну розподілялися на 2 групи: перша – дослідна з експериментальним стрептозоточинним ЦД (ЕСЦД) (одноразове внутрішньоочеревинне введення стрептозоточину («SIGMA Chemical» США) із розрахунку 6 мг/100 г маси тіла), друга – контрольна. Забір матеріалу здійснювали на 56-у добу від початку моделювання ЕСЦД. Для контролю за перебігом ЕСЦД в умовах віварію ми використовували портативний глюкометр «Accu-ChekActive» фірми «RocheDiagn. GH» (Німеччина) зі стандартним набором тест-смужок. Вміст HbA1c в крові визначали в сертифікованій лабораторії «Діамеб».

Усі маніпуляції, які проводилися з тваринами впродовж експерименту, не суперечили положенням Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 1986), Директиві Ради Європи 86/609/ЄЕС (1986), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 15 грудня 2009 року. Використали гістологічний (забарвлення за Нісслем) та електронно-мікроскопічний методи дослідження. Для морфометричних досліджень використовувались фотографії гістологічних, і напівтонких зрізів (поле зору світлового мікроскопа Leica DM750 фотографували за допомогою цифрової фотокамери ToprCam 5.2M UNCCD C-Mount Sony). Визначали чисельну щільність нейронів, гліоцитів і капілярів у зоровій корі на площі розміром $0,01\text{мм}^2$ [1], і гліальний індекс (співвідношення чисельної щільності гліоцитів і нейронів). Для морфометричних досліджень використали програмне забезпечення NIH USA «Image J» (США) та статистичний пакет Stat.Soft.Inc; Tulsa, OK, USA; Statistica 10.

Результати та їх обговорення

На 56-у добу розвитку ЕСЦД рівні глюкози і HbA1c зростають та становлять відповідно $19,18\pm 1,32$ ммоль/л (контроль – $4,89\pm 0,56$ ммоль/л, $p<0,001$), та $10,06\pm 0,98\%$ (контроль – $2,56\pm 0,18\%$, $p<0,001$), що вказує на розвиток некомпенсованого ЕСЦД.

У тварин із ЕСЦД у зоровій корі, на відміну від контрольної групи щурів, зростає чисельна щільність вакуолізованих нейронів до $27,2\pm 5,15$ (контроль – $3,0\pm 2,24$, $p=0,0122$) і пікноморфних – до $13,4\pm 1,67$ (контроль – $9,2\pm 2,91$, $p=0,0432$), при цьому чисельна щільність нормохромних нейронів зменшується до $21,0\pm 3,81$ (контроль – $48,6\pm 4,28$, $p=0,0119$). На 56-у добу ЕСЦД гліальний індекс зростає в 1,8 рази ($p=0,0356$), а кількість капілярів на $0,01\text{мм}^2$ зменшується до $7,1\pm 1,22$ (контроль – $11,8\pm 0,84$, $p=0,0112$). На напівтонких зрізах забарвлених метиленовим синім та гістологічних препаратах забарвлених за Нісслем відмічається збільшення чисельності вакуолізованих нейронів у внутрішньому пірамідному шарі в яких переважає центральний хроматоліз, тоді як у зовнішньому пірамідному шарі зростає чисельність пікноморфних нейронів, тоді як у контрольній групі тварин у різних шарах кори переважають нормохромні нейрони. У більшості нейронів спостерігається просвітлення каріоплазми. У судинах гемомікроциркуляторного русла візуалізуються еритроцитарні складжі. У перикапілярних просторах трапляються подвійне і потрійне розташування клітин-сателітів.

На ультраструктурному рівні найбільш виражених змін зазнають пікноморфні нейрони. У них спостерігається каріорексис. Ядерна оболонка утворює глибокі інвагінації, перинуклеарний простір відсутній. У більшості таких нейронів контури ядра нечіткі і навіть на ультраструктурному рівні важко провести чітку межу між каріоплазмою і електронно-щільною нейроплазмою. Спостерігається гіперплазія цистерн гранулярної ендоплазматичної сітки, які заповнюють майже всю нейроплазму перикаріона і є значно розширеними (рис. 1а). У нейроплазмі відмічаються дрібні і крупні лізосоми.

У внутрішньому пірамідному шарі зорової кори в більшості нейронів ядра, які збільшені в об'ємі, мають низької електронної щільності каріоплазму (рис. 1б). У нейроплазмі перикаріона значно збільшується кількість дрібних вакуолей. Розширюються і руйнуються цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки, на поверхні останніх зменшується кількість прикріплених рибосом. Останні заповнюють міжцистернову гіалоплазму та нейроплазму утворюючи полісомальні розетки. Більшість мітохондрій збільшені в об'ємі із дезорганізованими і частково зруйнованими кристами. Нерідко до нейронів різних шарів кори дуже щільно прилягають мікрогліоцити в цитоплазмі яких наявні вакуолі різних розмірів і форми. У зовнішньому пірамідному і внутрішньому зернистому шарах зорової кори зустрічаються нейрони із парціальним некрозом (рис. 1в). У перикаріонах таких нейронів

візуалізуються ядра, тоді як мембранні органели повністю зруйновані. Поряд спостерігаються структури нейропілія і нормохромні нейрони із звичайною ультраструктурною організацією. Нейрони із гідропічною дистрофією і

парціальним некрозом часто оточені мікро- і макрогліальними клітинами, в яких є велика кількість лізосом, аутофагосом і залишкових тілець, що дозволяє нам говорити про активні процеси нейрофагії.

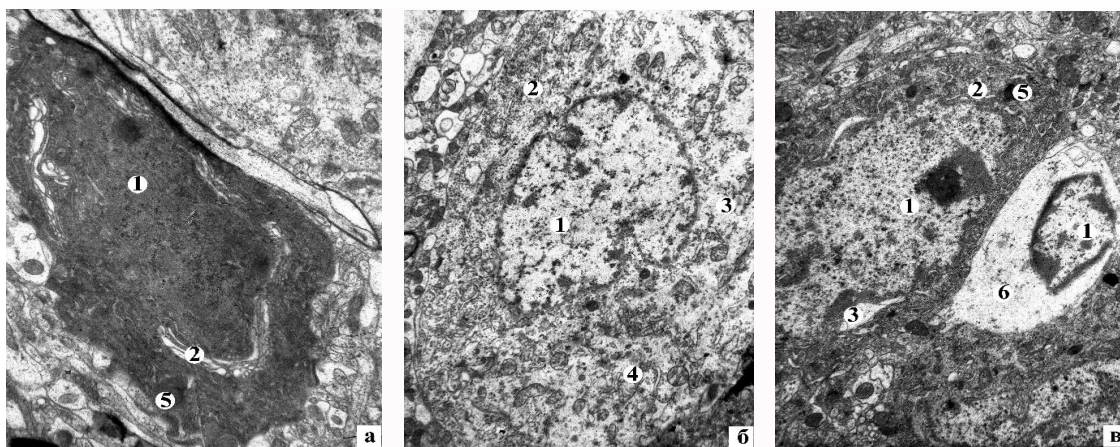


Рис. 1. Особливості ультраструктури пікноморфних (а), нормохромних (б) та деструктивно змінених (в) нейронів у зоровій корі щурів у віддалені терміни перебігу стрептозотонин індукованого цукрового діабету. 1 – ядро нейрона, 2 – гранулярна ендоплазматична сітка, 3 – вакуоля, 4 – мітохондрія, 5 – лізосома, 6 – коліквацийний некроз нейрона. Електронні мікрофотографії. А - $\times 6400$; б, в - $\times 4800$.

Такі зміни в зоровій корі відбуваються на тлі розвитку діабетичної мікроангіопатії. Площа просвіту капілярів зменшується до $8,52 \pm 1,18 \text{ мкм}^2$ (контроль – $11,44 \pm 2,01 \text{ мкм}^2$, $p=0,0367$), натомість стінки зростає до $22,54 \pm 2,29 \text{ мкм}^2$ (контроль – $11,44 \pm 2,01 \text{ мкм}^2$, $p=0,0317$). В ендотеліоцитах і перицитах на субмікроскопічному рівні спостерігаються явища гідропічної і вакуольної дистрофій (рис. 2), які проявляються: каріорексисом; розширенням цистерн гранулярної ендоплазматичної сітки і комплексу Гольджі; дисконплексацією і руйнуванням крист мітохондрій; наявністю дрібних вакуоль і балонів у цитоплазмі. Міжклітинні контакти між ендотеліальними клітинами дезорганізовані, інколи виявляються ділянки базальної мембрани, не вкриті ендотеліоцитами. Базальна мембрана є нерівномірно потовщеною, гомогенною. У перикапілярних просторах спостерігаються розширені ніжки астроцитів (рис. 2), що є одним із проявів діабетичної мікроангіопатії та призводить до зміни структури гематоенцефалічного бар'єра, а як наслідок до порушення трофіки нейронів. Самі астроцити зазнають значних деструктивних змін, а саме: у цитоплазмі навколо ядра збільшується чисельність первинних лізосом, а відростки розширені внаслідок набряку і містять поодинокі дрібні мітохондрії із зруйнованими кристами. Слід зазначити, що в нейропілі зорової кори на ультраструктурному рівні спостерігається розшарування ламел мієліну в мієлінових нервових волокнах, набряк

відростків волокнистих і протоплазматичних астроцитів та явища аксонопатії в тангенціальних пучках нервових волокон.

Такі зміни в нейронах центральної нервової системи різними авторами трактуються по-різному. Одні науковці [5, 9] вказують на те, що основну роль у розвитку діабетичної енцефалопатії при ЦД 1-го типу відіграє недостатність інсуліну і С-пептиду. В експерименті на щурах із стрептозотонинним ЦД доведено, що введення С-пептиду сприяє значному збереженню експресії нейротрофічних факторів у гіпокампі [8], попереджує розвиток атрофії білої речовини головного мозку [2]. Іншим фактором, який веде до ураження нейронів при ЦД є активація полііолового шляху обміну глюкози, який призводить до структурних змін у нейронах внаслідок підвищення сорбітолу і зниження вмісту таурину [6].

Проте більшість дослідників притримуються думки, що одним із основних патогенетичних факторів розвитку діабетичної енцефалопатії є діабетична мікроангіопатія при ЦД, що призводить до порушення мозкового кровотоку [4]. Тканинна гіпоксія переключає енергетичне забезпечення нервової тканини з аеробного на енаеробний гліколіз. Внаслідок цього в нейронах зменшується вміст фосфокреатину, зростає вміст лактату і розвивається лактатацидоз, який призводить до структурно-функціональних порушень в нейронах і глії та сприяє розвитку діабетичної енцефалопатії.

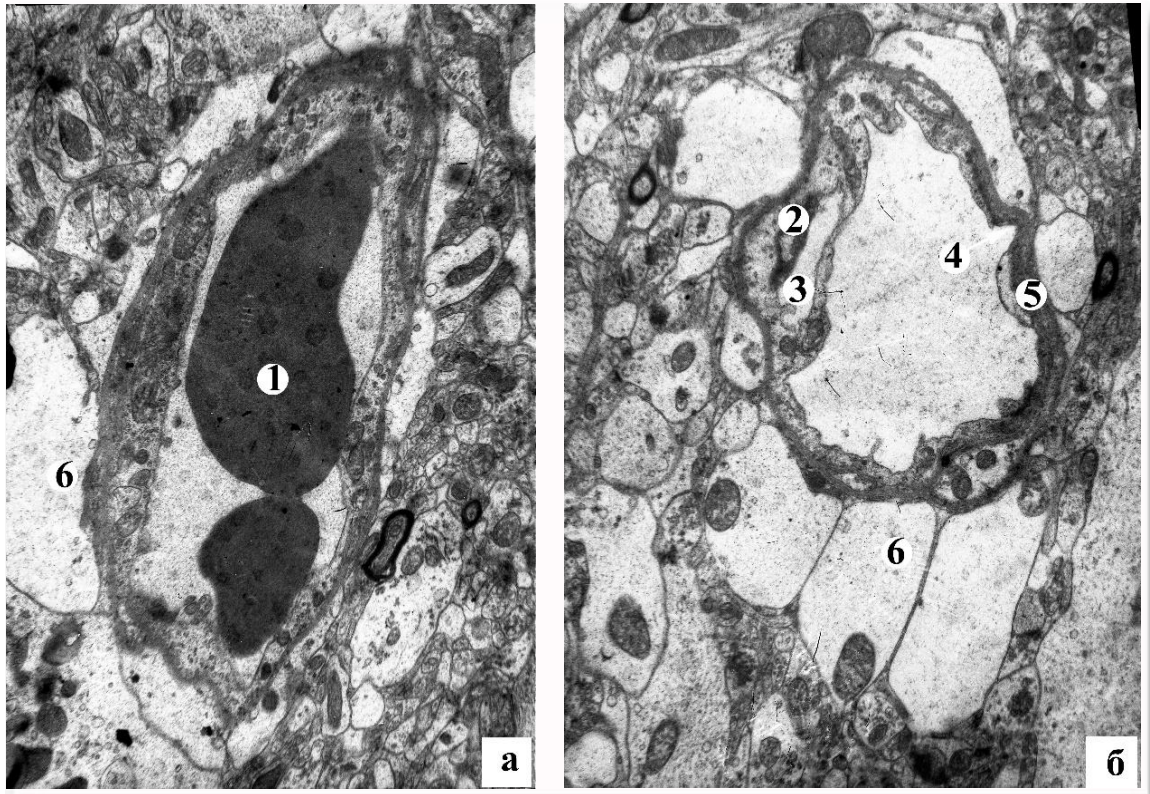


Рис. 2. Еритроцитарні саджі у просвіті капілярів (а) та розширені астроцитарні ніжки в гематоенцефалічному бар'єрі (б) зорової кори щурів на 56-у добу ЕСЦД. 1 – еритроцит, 2 – ядро ендотеліоцита, 3 – балон, 4 – оголення базальної мембрани, 5 – потовщена базальна мембрана, 6 – розширені ніжки астроцитів. Електронні мікрофотографії. $\times 6400$.

Розвиток діабетичної мікроангіопатії ми спостерігали в своєму дослідженні, морфологічними проявами його були гемореологічні порушення, а саме: адгезія і агрегація еритроцитів і тромбоцитів, мікроклазмотоз. Такі зміни крові пов'язані із гіперпродукцією трмбоксану А2, зниженням фібринолізу внаслідок підвищення вмісту інгібітора-І активатора плазміногену [7, 10]. За даними наших досліджень відмічається потовщення базальної мембрани, як один із морфологічних маркерів розвитку діабетичної мікроангіопатії, через відкладання в ній глікопротеїнів і глікозаміногліканів [4, 7].

Висновки

На 56-у добу перебігу стрептозотонин індукованого ЦД в зоровій корі головного мозку щурів діагностується діабетична енцефалопатія, яка морфологічно проявляється: збільшенням чисельної щільності пікноморфних і вакуолізованих нейронів за рахунок зменшення чисельної щільності нормохромних нейронів; явищами сателітозу, нейронофагії та аксонопатії в тангенціальних пучках нервових волокон нейропіля. Такі зміни відбуваються на тлі розвитку діабетичної мікроангіопатії, яка характеризується: еритроцитарними сладжами, адгезією тромбоцитів і мікротромбами в просвіті мікросудин; збільшенням площі стінки

капілярів при зменшенні площі їхнього просвіту; потовщенням базальної мембрани; перикапілярним набряком ніжок астроцитів.

Перспективи подальших досліджень

Перспективним є дослідження зорової кори при стрептозотонин індукованому ЦД та його корекції різними анти діабетичними препаратами, що стане теоретичним підґрунтям для удосконалення існуючих та розробки нових методів лікування діабетичних енцефалопатій.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної теми «Вікові особливості патоморфогенезу деяких органів нейроендокринної, серцево-судинної, травної та дихальної систем при цукровому діабеті» (номер державної реєстрації 0116U003598).

Літературні джерела References

1. Sleep GO. [Current approaches to the treatment of diabetic retinopathy]. *Advances in biology and medicine*. 2017;30(2):75-80. Ukrainian.
2. Tumansky VA, Avramenko UN. Some aspects of morphogenesis of diabetic encephalopathy. *Zaporozhye Medical Journal*. 2013;79(4):39–42. Russian.
3. Essin WG, Khairullin IX, Ziangirova ST, Isaeva UN, Essin OR. [Diabetic encephalopathy: pathogenesis, clinical manifestations, approaches to therapy]. *Clinician*. 2012;3-4:10-16. Russian.
4. Zhurakivska OY, Popovich YI, Oliynyk YI, Miskiv VA, Zhurakivsky VM, Tymoschuk OJ. [Features of morphofunctional restructuring of the hypothalamic-neurohypophysial system of immature rats in the early stages of experimental diabetes]. *Bulletin of problems of biology and medicine*. 2018;145(3):288-294. Ukrainian.
5. Brismar T, Hyllienmark , Ekberg K, Johansson BL. [Loss of temporal lobe beta power in young adults with type 1 diabetes mellitus]. *Neuroreport*. 2002;13(18):2469–73.
6. Sima AA, Zhang W, Muzik O. [Sequential abnormalities in type 1 diabetic encephalopathy and the effect of C-peptide]. *Rev Diabet Stud* 2009;6(3):211–22.
7. Sima AA. [Encephalopathies: the emerging diabetic complications]. *Acta Diabetol*. 2010;47(4):279–93.
8. Malone JI, Hanna S, Saporta S. et al. [Hyperglycemia not hypoglycemia alters neuronal dendrites and impairs spatial memory]. *Pediatr Diabetes*. 2008;9(6):531–9.
9. Roustit M, Loader J, Deussenberg C, Baltzis D, Veves A. Endothelial Dysfunction as a Link Between Cardiovascular Risk Factors and Peripheral Neuropathy in Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016; 101(9): 34018.
10. Yang X, Huo F, Liu B, Liu J, Chen T, Li J, Zhu Z, Lv B. [Crocins Inhibits Oxidative Stress and Pro-inflammatory Response of Microglial Cells Associated with Diabetic Retinopathy Through the Activation of PI3K/Akt Signaling Pathway]. *J Mol Neurosci*. 2017; 61(4): 581-589. doi: 10.1007/s12031-017-0899-8.

Щур М.Б., Жураківська О.Я. морфологічна характеристика зорової кори при експериментальному цукровому діабеті.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Медико-соціальна проблема цукрового діабету зумовлена значною поширеністю, ранньою інвалідністю і смертю хворих унаслідок специфічних ускладнень, одним із яких є діабетична енцефалопатія. За даними наукової літератури остання діагностується у 80,7% хворих із ЦД 1-го типу. **Мета.** Метою нашої роботи було встановлення гісто-ультраструктурних змін зорової кори на 56-у добу розвитку стрептозотоцин індукованого ЦД (СЦД). **Методи дослідження.** Для дослідження використано 10 статевозрілих білих щурів-самців (масою тіла 160-180 г), які порівну розподілялися на 2 групи: перша – дослідна з СЦД (одноразове внутрішньоочеревинне введення стрептозотоцину («SIGMA Chemical» США) із розрахунку 6 мг/100 г маси тіла), друга – контрольна. Для морфометричних досліджень використали програмне забезпечення NIH USA «Image J» (США) та статистичний пакет Stat.Soft.Inc; Tulsa, OK, USA; Statistica 10. **Результати.** У тварин із СЦД, на відміну від контрольної групи щурів, зростає кількість вакуолізованих і пікноморфних нейронів на фоні зменшення нормохромних нейронів на 0,01 мм² зорової кори. При цьому гліальний індекс зростає в 1.8 раза, а кількість капілярів на 0,01 мм² зменшується в 1.7 раза. На ультраструктурному рівні найбільш виражених змін зазнають пікноморфні нейрони, які переважають у внутрішньому пірамідному шарі. У зовнішньому пірамідному і внутрішньому зернистому шарах зорової кори зустрічаються нейрони із парціальним некрозом. Такі зміни в зоровій корі відбуваються на тлі розвитку діабетичної мікроангіопатії. Таким чином, на 56-у добу перебігу СЦД в зоровій корі щурів діагностується діабетична енцефалопатія, яка морфологічно проявляється: збільшенням чисельної щільності пікноморфних і вакуолізованих нейронів за рахунок зменшення нормохромних нейронів; явищами сателітозу та нейронофагії; аксонопатією в тангенціальних пучках нервових волокон нейропілія. **Підсумок.** Такі зміни відбуваються на тлі розвитку діабетичної мікроангіопатії, яка характеризується: еритроцитарними складками, адгезією тромбоцитів і мікротромбами в просвіті мікросудин; збільшенням площі стінки капілярів при зменшенні площі їхнього просвіту; потовщенням базальної мембрани; перикапілярним набряком відростків астроцитів.

Ключові слова: зорова кора, нейрон, стрептозотоциновий цукровий діабет.

Щур М.Б., Жураковская О.Я. Морфологическая характеристика зрительной кори при экспериментальном сахарном диабете.

РЕФЕРАТ. Актуальность. Медико-социальная проблема сахарного диабета (СД) обусловлена значительной распространенностью, ранней инвалидностью и смертью больных вследствие специфических

осложнений, одним из которых является диабетическая энцефалопатия. По данным научной литературы последняя диагностируется в 80,7% больных с СД 1-го типа. Поэтому **целью** нашей работы было установление гисто- ультраструктурных изменений зрительной коры на 56 сутки развития стрептозотоциндукованого СД (ССД). **Методы.** Для исследования использованы 10 половозрелых белых крыс-самцов (массой тела 160-180 г), которые поровну распределялись на 2 группы: первая - исследовательская с ССД (однократное внутривентрикулярное введение стрептозотоцина («SIGMA Chemical» США) из расчета 6 мг / 100 г массы тела), вторая - контрольная. Для морфометрических исследований использовали программное обеспечение NIH USA «Image J» (США) и статистический пакет Stat.Soft.Inc; Tulsa, OK, USA; Statistica 10. **Результаты.** У животных с ССД, в отличие от контрольной группы крыс, растет количество вакуолизованных и пикноморфных нейронов на фоне уменьшения нормохромных нейронов на 0,01 мм² зрительной коры. При этом глиальный индекс увеличивается в 1.8 раза, а количество капилляров на 0,01 мм² уменьшается в 2.2 раза. На ультраструктурном уровне наиболее выраженных изменений испытывают пикноморфные нейроны, которые локализируются во внутреннем пирамидном слое. Во внешнем пирамидном и внутреннем зернистом слоях зрительной коры встречаются нейроны с парциальным некрозом. Такие изменения в зрительной коре происходят на фоне развития диабетической микроангиопатии. Таким образом, на 56 сутки течения ССД в зрительной коре крыс диагностируется диабетическая энцефалопатия, которая морфологически проявляется: увеличением численной плотности пикноморфных и вакуолизованных нейронов за счет уменьшения нормохромных нейронов; явлениями сателлитоза и нейронофагии; аксонопатией в тангенциальных пучках нервных волокон нейропилия. **Выводы.** Такие изменения происходят на фоне развития диабетической микроангиопатии, которая характеризуется: эритроцитарными сдвигами, адгезией тромбоцитов и микротромбами в просвете микрососудов; увеличением площади стенки капилляров при уменьшении площади их просвета; утолщением базальной мембраны; перикапиллярным отеком ножек астроцитов.

Ключевые слова: зрительная кора, нейрон, стрептозотоциновый сахарный диабет.