

О.М. Слободян¹
О.В. Дудок²
Н.О. Амбарова²

¹ Буковинський державний
медичний університет
Чернівці

² Львівський національний
медичний університет імені
Данила Галицького
Львів, Україна

Надійшла: 14.08.2024

Прийнята: 15.06.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.2.61-65>

УДК:611.16.018.1:616.379-008.64-092.4

ПАТОМОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ КАПІЛЛЯРІВ ПРИ СТРЕПТОЗОТОЦИНІНДУКОВАНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ

Slobodyan O.M. , Dudok O.V. , Ambarova N.O.  Pathomorphological changes in capillaries in streptozotocin-induced diabetes.

Bukovynian State Medical University, Chernivtsi, Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine.

ABSTRACT. Background. Ophthalmological complications of diabetes mellitus remain a significant medical and social problem worldwide. Considering the aforementioned, diabetic damage to the structures of the eye continues to be a relevant problem as a result of the development of diabetic angiopathy. **Aim.** The aim of our study was to investigate the structure of blood and lymphatic capillaries and their relationship with the interstitium of the conjunctiva in rats with diabetic angioretinopathy. **Methods.** The study was conducted on 15 adult, non-pedigree white male rats weighing 120-130 g. Experimental diabetes mellitus was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (Sigma) at a dose of 7 mg per 100 g of body weight. The development of diabetes was monitored for 2 weeks by measuring blood glucose levels using the glucose oxidase method. The study was performed from the fourth week of the experiment on animals with glucose levels exceeding 15.58 mmol/l. The study included 2 groups of animals: group 1 (10 animals) with developed diabetes mellitus (4 weeks after streptozotocin injection); group 2 (5 animals) served as a control and received injections of 0.9% saline solution for 4 weeks. Samples for ultrastructural analysis were prepared using standard techniques. In the electron histochemical analysis of conjunctival biopsies from rats with streptozotocin-induced diabetes, triglycerides and glycoproteins were investigated using ruthenium red. **Results and conclusion.** Our research demonstrated that excessive accumulation of carbohydrate-protein fractions from endothelial cells leads to the formation of periepithelial edema. Electron histochemical analysis revealed the presence of a finely granular substance of medium electron density in the periepithelial space, which stained with ruthenium red. This finding indicates an increased content of carbohydrate-protein components. The elevated production of glycosaminoglycans in experimental streptozotocin-induced diabetes is attributed to metabolic disturbances, as endothelial cells are capable of synthesizing elastin, collagen, and glycosaminoglycans. Further, depending on the duration of metabolic disturbances and the progression of the disease with its widening due to significant accumulation of fine-grained ruthenium-positive material. In some capillaries, intensive accumulation of ruthenium-positive material of medium electron density was observed, surrounding the microvessels over a considerable length. The pericapillary space is widened. It accumulates proteins, cellular breakdown products, and triglycerides. Extensive interstitial tissue edema is noted due to the accumulation of glycosaminoglycans and plasma proteins in perivascular spaces, collectively generating high osmotic pressure. Investigating the structural remodeling of blood and lymphatic capillaries and their relationship with the conjunctival interstitium in rats with diabetic angioretinopathy at the end of the fourth week of experimental streptozotocin-induced diabetes will allow for a comparison of the depth of the pathological changes at different time points. This will further contribute to establishing a basis for determining the optimal timeframes, from a morphological perspective, for conducting drug-based correction of changes in eye tissues during the subchronic phase of hyperglycemia. The goal is to stabilize developing and progressively worsening manifestations of diabetic angiopathy.

Key words: Eye, membranes, capillary, microcirculation, retinopathy, experiment, pathology, diabetes, rat.

Citation:

Slobodyan OM, Dudok OV, Ambarova NO. [Pathomorphological changes in capillaries in streptozotocin-induced diabetes]. Morphologia. 2023;17(2):61-5. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.2.61-65>

 Slobodyan O.M. 0000-0003-4833-0730;  Dudok O.V. 0000-0001-9513-3460

 Ambarova N.O. 0000-0002-6867-6803

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Оскільки цукровий діабет є одним із самих розповсюджених ендокринних захворювань, вивчення на експериментальних моделях морфологічних змін тих чи інших тканин методами, що мають обмежене застосування у прижиттєвому дослідженні хворих, є на сьогодні особливо актуальним [1-5]. Це дає можливість отримати нові дані про патогенез та динаміку змін у тканинах та органах на різних термінах захворювання. Такі дані можуть мати практичне застосування і у майбутніх дослідженнях слугувати розробці діагностичних та профілактичних заходів щодо даної патології.

Ураження структур органу зору у світі колюється в межах від 67% до 99%. Чисельні клінічні та експериментальні дослідження встановили взаємозв'язок захворювань тканин ока зі станом соматичного здоров'я, зокрема станом ендокринної системи [6-8].. Самі чисельні і одночасно суперечні відомості торкаються судинної концепції хронічного ураження оболонок очного яблука, сформульовані, ще в минулому сторіччі. Порушенню мікроциркуляції відводиться велика роль у процесах патогенезу при діабетичних мікроангіопатіях. [9,10].

Тому, вважаю, що дане дослідження є актуальним як з точки зору експериментального та морфологічного дослідження, так і з практичної точки зору, оскільки його дані можуть бути враховані та використані як у офтальмологічній, так і ендокринологічній практиці. Враховуюче вищезгадане, діабетичне ураження структур очного яблука і надалі залишається актуальною проблемою можливого розвитку діабетичного ураження судин.

Мета дослідження: вивчити будову кровоносних та лімфатичних капілярів та їх взаємовідношення з інтерстицієм кон'юктиви ока щурів з явищами діабетичної ангіоретинопатії.

Матеріали та методи

Дослідження проводили на 15 статевозрілих, безпородних білих щурах-самцях, масою 120-130 г.

Експериментальний цукровий діабет викликали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення стрептозоточину фірми "Sigma" з розрахунку 7 мг на 100 г маси тіла (приготованому на 0,1 моль цитратному буфері, pH=4,5). Розвиток цукрового діабету контролювали впродовж 2 тижнів за зростанням рівня глюкози в крові, яку вимірювали глюкозооксидним методом. Дослідження проводили з четвертого тижня експерименту на тваринах з рівнем глюкози понад 15,58 ммоль на 1 л. У роботі використовували 2 групи тварин: 1 - група (10 тварин) - з цукровим діабетом, що розвинувся (4 тижні після введення стрептозоточину); 2 - група була контрольною (5 тварин), отримували ін'єкції 0,9% фізіологічного розчину упродовж 4 ти-

жнів.

Усі тварини знаходились в умовах віварію і процедури, що стосувалися питань утримання, догляду, маркування та всі інші маніпуляції проводилися із дотриманням положень "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" [Страсбург, 1985], "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах", ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики [Київ, 2001], Закону України № 3447 – IV «Про захист тварин від жорстокого поводження». Комісією з біоетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького встановлено, що проведені наукові дослідження відповідають етичним вимогам згідно наказу МОЗ України № 231 від 01.11.2000 року (протокол № 10 від 26.12.2011 року), (протокол №2 від 20 лютого 2012 року). Перед забором матеріалу дослідної ділянки тварину виводили з експерименту за допомогою дієтичного ефіру. Для електронномікроскопічного дослідження використовували очні яблука щурів (пересікалися по ділянці лімба). Препарати для ультраструктурного дослідження готували за загальноприйнятою методикою. В результаті проведеного електронгістохімічного дослідження біоптатів кон'юктиви щурів з стрептозоточиніндукованим цукровим діабетом ми досліджували тригліцериди та глікопротеїни рутенієвим червоним. [11]. Вивчення і фотографування матеріалу проводили за допомогою мікроскопу УЕМВ – 100 К (Україна) при прискорюючій напрузі 75 кВ і збільшеннях на екрані мікроскопу 15000х — 30000х.

Результати та їх обговорення

При проведенні ультраструктурного дослідження наприкінці четвертого тижня експериментального стрептозоточин індукованого цукрового діабету нами було вивчено будову кровоносних капілярів та їх взаємовідношення з інтерстицієм кон'юктиви ока щурів з явищами діабетичної ангіоретинопатії.

Електронномікроскопічне та електронгістохімічне дослідження виявило, що у просвіті кровоносних капілярів спостерігаються різні по формі агрегати у вигляді «монетних» стовбчиків з явищами діapedезу у перикапілярному просторі. Одночасно з цим у мембрані еритроцитів відмічається інтенсивне накопичення тригліцеридів. Внаслідок зміни структури еритроцитарної мембрани та підвищення її проникності у судинному руслі з'являються гемолізовані еритроцити. Наприкінці четвертого тижня експериментального стрептозоточинового цукрового діабету з явищами діабетичної ангіопатії гіперагрегація частіше всього проявляється у вигляді складж – синдрома з абсорбцією на поверхні еритроцитів плазменних білків, фібриногена, а також тригліцеридів, які зв'язують еритроцити у вигляді три-

гліцеридних мостиків. Клітинний детрит та окремі фрагменти гемолізованих еритроцитів є потужним активатором агрегації тромбоцитів, що призводить до утворення еритроцитарно-тромбоцитарних агрегатів з подальшим випадінням фібрину.

Метаболічні зміни як наслідок інсулінової недостатності при цукровому діабеті призводить до внутрішньосудинних реологічних зсувів і одночасно до морфологічних змін зі сторони ендотелію кровоносних капілярів. Ми спостерігали при діабетичній ангіопатії структурно – метаболічну гетерогенність ендотеліоцитів. В ендотелії капілярів були виявлені ознаки посиленого транскапілярного обміну. По мірі підвищення показників глюкози крові прогресували судинні прояви та дистрофічні порушення. Спостерігається набряк ендотеліоцитів зі зниженням кількості органел та піноцитозних пухирців, трансформація гранулярного ендоплазматичного ретикулулу в агранулярний з подальшою його вакуолізацією, дистрофічні зміни мітохондрій з утворенням мієліноподібних структур, вторинних лізосом та аутофагічних вакуолей.

Досить часто зустрічаються ендотеліоцити в стані вираженої дистрофії, що призводить у подальшому до ураження та руйнування їх, з подальшим вивільненням білкових макромолекул, формених елементів крові та тригліцеридів з судинного русла у міжклітинний простір.

Внаслідок цього кількість функціонуючих кровоносних капілярів зменшується, що призводить до порушення мікроциркуляції та ішемії тканин. Крім того, деструкція ендотеліоцитів з накопиченням клітинного детриту, фібрину, тригліцеридів та білкових коагулянтів у просвіті кровоносних капілярів сприяє розвитку хронічної внутрішньосудинної коагуляції крові. Внаслідок дистрофічних та реологічних змін кількість функціонуючих та резервних кровоносних капілярів поступово зменшується.

Виникає потовщення базальної мембрани кровоносних капілярів, у генезі цього процесу велике значення мають тривалість та важкість порушення стану ендотелію. При цьому ми виявили деструкцію ендотеліальних клітин, злущування їх, мікроклазматоз з боку не тільки люмінальної цитомембрани, але і базальної мембрани. Детритна маса між концентричними шарами базальної мембрани складається з уламків ендотеліоцитів і перичитів. При пошкодженні ендотеліальних клітин відзначаються посилений вихід плазми, фібрину, тригліцеридів, гранул лізосом зруйнованих клітин та інших продуктів обміну з просвіту кровоносних капілярів та відкладення їх у шарах базальної мембрани.

Результатом надмірного накопичення вуглеводно-білкових фракцій від ендотеліальних клітин є утворення періендотеліального набряку. Електронно-гістохімічне дослідження показало,

що періендотеліальний простір містить дрібнозернисту речовину середньої електронної щільності, що забарвлюється рутенієвим червоним. Це також свідчить про підвищений вміст вуглеводно-білкових компонентів. Підвищена продукція глікозаміногліканів при експериментальному стрептозототиніндукованому цукровому діабеті обумовлена, метаболічними порушеннями, так як ендотеліоцити здатні синтезувати еластин, колаген та глікозаміноглікани.

В подальшому в залежності від тривалості метаболічних порушень з перебігом захворювання розвиваються більш глибокі зміни базальної мембрани, відзначається розширення її внаслідок значного накопичення дрібнозернистої рутенієвопозитивної речовини. У деяких капілярах виявлено інтенсивне накопичення рутенієвопозитивного матеріалу середньої електронної щільності, що оточує мікросудини на значному протязі. Перикапілярний простір розширений. У ньому накопичуються білки, продукти розпаду клітин, тригліцериди. Відзначається великий набряк інтерстиціальної тканини внаслідок накопичення в перивазальних просторах глікозаміногліканів та плазмових білків, які спільно створюють високий осмотичний тиск.

Продукти розпаду клітин накопичуються також навколо лімфатичних капілярів. Лімфатичні капіляри розташовуються в сполучному прошарку, що має тонку ендотеліальну вистилку без базальної мембрани. Через розкриті контакти між ендотеліоцитами відбувається резорбція білкового детриту та тригліцеридів з інтерстиціальної тканини у просвіт лімфатичних капілярів. Деякі капіляри переповнені білковим детритом. Відзначається накопичення його в перикапілярному просторі. Внаслідок резорбційної недостатності лімфатичних капілярів білкові продукти та тригліцериди з інтерстиціальної тканини видаляються не повністю. При недостатності функції лімфатичної системи в інтерстиціальній тканині накопичуються білкові продукти і застійна лімфа, які в свою чергу руйнують інтерстиціальну тканину, паренхіматозні елементи і систему гемомікроциркуляції.

Підсумок

У результаті зміни гематолімфатичної рівноваги відбувається накопичення в інтерстиціальній тканині дисмета-болітів, так як темпи розпаду клітин при цукровому діабеті превалюють над резорбційною функцією лімфатичних капілярів. Внаслідок цього порушення гематолімфатичної рівноваги позначається на всій системі мікроциркуляції. Порушений дренаж продуктів розпаду клітин, білкового детриту, тригліцеридів, глікозаміногліканів та їх накопичення в інтерстиціальній тканині негативно впливають на інтерстиціальний простір та мікроциркуляторне русло, тим самим відіграючи важливу роль у патогенезі діабетичних ангіопатій.

Перспективи подальших досліджень

Вивчення структурної перебудови кровоносних та лімфатичних капілярів та їх взаємовідношення з інтерстецієм кон'юктиви ока щурів з явищами діабетичної ангіоретинопатії. Наприкінці четвертого тижня експериментального стрептозототиніндукованого цукрового діабету дасть можливість провести порівняння глибини патоморфологічних змін на різних термінах, що в подальшому сприятиме створенню патоморфологічного підґрунтя для встановлення оптимальних з точки зору морфології термінів проведення медикаментозної корекції змін у тканинах очного яблука у субхронічний термін впливу

гіперглікемії з метою стабілізації виникаючих та в подальшому прогресуючих явищ діабетичної ангіопатії.

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 виконано в рамках науково-дослідної теми «Морфофункціональні особливості органів у пре- та постнатальному періодах онтогенезу, при впливі опіоїдів, харчових добавок, реконструктивних операцій та ожирінні» (номер державної реєстрації 0120U002129).

Літературні джерела References

1. Chandrasekaran PR, Madanagopalan VG, Narayanan R. Diabetic retinopathy in pregnancy - A review. *Indian journal of ophthalmology*. 2021;69(11):3015–3025. doi:10.4103/ijo.IJO_1377_21.
2. Do DV, Han G, Abariga SA, Sleilati G, Vedula SS, Hawkins BS. Blood pressure control for diabetic retinopathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2023 Mar 28;3(3):CD006127. doi:10.1002/14651858.
3. Cheng L, Barlis P, Gibson J, Colville D, Hutchinson A, Gleeson G, Lamoureux E, VanGaal W, Savage J. Microvascular retinopathy and angiographically-demonstrated coronary artery disease: A cross-sectional, observational study. *PLoS One*. 2018 May 8;13(5):e0192350. doi:10.1371/journal.pone.0192350.
4. Groeneveld Y, Tavenier D, Blom JW, Polak BCP. Incidence of sight-threatening diabetic retinopathy in people with Type 2 diabetes mellitus and numbers needed to screen: a systematic review. *Diabet Med*. 2019 Oct;36(10):1199-1208. doi:10.1111/dme.13908.
5. Medina-Ramirez SA, Soriano-Moreno DR, Tuco KG, Castro-Diaz SD, Alvarado-Villacorta R, Pacheco-Mendoza J, Yovera-Aldana M. Prevalence and incidence of diabetic retinopathy in patients with diabetes of Latin America and the Caribbean: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2024 Apr 4;19(4):e0296998. doi:10.1371/journal.pone.2024044.
6. Chang YS, Tai MC, Ho CH, Chu CC, Wang JJ, Tseng SH, Jan RL. Risk of Corneal Ulcer in Patients with Diabetes Mellitus: A Retrospective Large-Scale Cohort Study. *Sci Rep*. 2020;10(1):73-88.
7. Wang B, Yang S, Zhai HL, Zhang YY, Cui CX, Wang JY, Xie LX. A comparative study of risk factors for corneal infection in diabetic and non-diabetic patients. *Int. J. Ophthalmol*. 2018;11(1):43-47.
8. Badawi AE, Moemen D, El-Tantawy NL. Epidemiological, clinical and laboratory findings of infectious keratitis at Mansoura Ophthalmic Center, Egypt. *Int. J. Ophthalmol*. 2017;10(1):61-67.
9. Hovind P, Tarnow L, Rossing K. et al. Decreasing incidence of severe diabetic microangiopathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2003;Vol. 26(4):1258-1264.
10. Azad R, Sinha S, Nishant P. Asymmetric diabetic retinopathy. *Indian journal of ophthalmology*. 2021;69(11):3026–3034. https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_1525_21
11. Horalskyi LP, Khomych VT, Kononskyi OI. [Basics of histological technique and morpho-functional research methods in normal and pathological conditions]. *Zhytomyr: Polissia*. 2015. 286 p. Ukrainian.

Слободян О.М., Дудок О.В., Амбарова Н.О. Патоморфологічні зміни капілярів при стрептозототиніндукованому цукровому діабеті.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Офтальмологічні ускладнення цукрового діабету і сьогодні становлять величезну медичну та соціальну проблему у всьому світі. Враховуюче вищезгадане, діабетичне ураження структур очного яблука і надалі залишається актуальною проблемою як наслідок розвитку діабетичної ангіопатії. **Метою** нашого дослідження стало вивчення будови кровоносних та лімфатичних капілярів та їх взаємовідношення з інтерстецієм кон'юктиви ока щурів з явищами діабетичної ангіоретинопатії. **Методи.** Дослідження проводили на 15 статевозрілих, безпородних білих щурах-самцях, масою 120-130 г. Експериментальний цукровий діабет викликали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення стрептозототину фірми "Sigma" з розрахунку 7 мг на 100 г маси тіла (приготованому на 0,1 моль цит-

ратному буфері, рН=4,5). Розвиток цукрового діабету контролювали впродовж 2 тижнів за зростанням рівня глюкози в крові, яку вимірювали глюкозооксидазним методом. Дослідження проводили з четвертого тижня експерименту на тваринах з рівнем глюкози понад 15,58 ммоль на 1 л. У роботі використовували 2 групи тварин: 1 - група (10 тварин) - з цукровим діабетом, що розвинувся (4 тижні після введення стрептозотацину); 2 – група була контрольною (5 тварин), отримували ін'єкції 0,9% фізіологічного розчину впродовж 4 тижнів. Для електронномікроскопічного дослідження використовували очні яблука щурів (пересікалися по ділянці лімба). Препарати для ультраструктурного дослідження готували за загальноприйнятою методикою В. В результаті проведеного електроногістохімічного дослідження біоптатів кон'юктиви щурів з стрептозотациніндукованим цукровим діабетом ми досліджували тригліцериди та глікопротеїни рутенієвим червоним. Вивчення і фотографування матеріалу проводили за допомогою мікроскопу УЕМВ – 100 К (Україна) при прискорюючій напрузі 75 кВ і збільшеннях на екрані мікроскопу 15000-30000. **Результати та підсумок.** Результатом надмірного накопичення вуглеводно-білкових фракцій від ендотеліальних клітин є утворення періендотеліального набряку. Електронно-гістохімічне дослідження показало, що періендотеліальний простір містить дрібнозернисту речовину середньої електронної щільності, що забарвлюється рутенієвим червоним. Це також свідчить про підвищений вміст вуглеводно-білкових компонентів. Підвищена продукція глікозаміногліканів при експериментальному стрептозотациніндукованому цукровому діабеті обумовлена, метаболічними порушеннями, так як ендотеліоцити здатні синтезувати еластин, колаген та глікозаміноглікани. В подальшому в залежності від тривалості метаболічних порушень з перебігом захворювання розвиваються більш глибокі зміни базальної мембрани, відзначається розширення її внаслідок значного накопичення дрібнозернистої рутенієвопозитивної речовини. У деяких капілярах виявлено інтенсивне накопичення рутенієвопозитивного матеріалу середньої електронної щільності, що оточує мікросудини на значному протязі. Перикапілярний простір розширений. У ньому накопичуються білки, продукти розпаду клітин, тригліцериди. Відзначається великий набряк інтерстиціальної тканини внаслідок накопичення в перивазальних просторах глікозаміногліканів та плазмових білків, які спільно створюють високий осмотичний тиск. Вивчення структурної перебудови кровоносних та лімфатичних капілярів та їх взаємовідношення з інтерстецієм кон'юктиви ока щурів з явищами діабетичної ангіоретинопатії наприкінці четвертого тижня експериментального стрептозотациніндукованого цукрового діабету дасть можливість провести порівняння глибини патоморфологічних змін на різних термінах, що в подальшому сприятиме створенню патоморфологічного підґрунтя для встановлення оптимальних з точки зору морфології термінів проведення медикаментозної корекції змін у тканинах очного яблука у субхронічний терміни впливу гіперглікемії з метою стабілізації виникаючих та в подальшому прогресуючих явищ діабетичної ангіопатії.

Ключові слова: Око, оболонки, капіляр, мікроциркуляція, ретинопатія, експеримент, патологія, діабет, щур.