Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա, Հայաստանի Կենսոսրանական Հանդես Национальная Академия Наук Армении, Биологический Журнал Армении National Academy of Sciences of Armenia, Biological Journal of Armenia

Биолог. журн. Армении, 1-2 (58), 2006

УДК 577.354.2 : 611.843.1

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ СВЕТОНОВРЕЖДЕНИЯ В СЕТЧАТКЕ ГЛАЗА БЕЛЫХ КРЫС

л.л. погосян

Институт биохимии им. Бунятяна НАН РА. 375014, Ереван

Изучались морфологичские изменения, возникающие при систоповреждении в различных участках сетчатки глаза белых крыс. Выявлено, что сильнее всего поражалясь центральная часть сетчатки, что выражалось в полной деструкции наружных сегментор палочек, а также уменьшении толщины наружного ядерного слоя сетчатки (НЯС). В периферичсской сетчатке изменения были выражены в меньщей степени В дальнейщем метолика может быть применена для моделирования дегенеративных процессов в сетчатке.

Սպիտակ առնետների աչքի ցանցաթաղանքում հետազոտվել են կառուցվացքային փոփոխությունները, որոնք առաջանում են լույսով վնասման հետևանքով։ Բացահայտվել է, որ առավել վնասվում էր ցանցաթաղանքի կենտրոնական հատվածը, ինչը արտահայտվում էր ցուպիկների արտաքին սեզմենտների լրիվ քայքայմամբ, ինչպես նաև բարակում էր արտաքին կորիզային շերտը (ԱԿՇ)։ Պերիֆերիկ ցանցաթաղանքում փոփոխություններն արտահայտված են ավելի քիչ։ Դետագայում լուսավնասման տվյալ մեքողը կարելի է կիրառել ցանցաթաղանքում դեզեննրատիվ պրոցեսների մողելավորման համար։

The structural changes after light induced damage in different parts of albino rat retina have been studied. It has been revealved, that mostly was damaged the central part of retina which is visible by full destuction of rod outer segments as well by reduction of the outer nuclear layer (ONL) of the retina. In peripheral parts degenerative changes were less extensive. In further this method can be used for modeling of retinal degeneration.

Сетчатка глаза - фоторецепторы - светоповреждение

Свет в зрении может выступать двояко: и как носитель сенсорной информации, и как потенциально опасный повреждающий фактор.

Свет, оказывая влияние на молекулярные и клеточные механизмы, приводит к изменениям в структуре и физиологии сетчатки глаза [13]. Длительное действие света повышенной интенсивности на сетчатку приводит к светоповреждению се зрительных клеток.

В основе механизмов светового повреждения сстчатки лежат процессы фотосенсибилизированного свободнорадикального окисления полиненасыщенных жирных кислот. белков и ДНК [1, 4, 5, 7]. Фотосенсибилизаторами могут служить как экзогенные, так и энлогенные хромофоры и, в нервую очередь, ретиналь и продукты его превращения [2].

Также активизируется ферментативный ряд каспаз и происходит экспрессия некоторых генов, которые активируют механизмы аполтоза клегок

[6] Нарушается процесс фотогрансдукции, фотоокисленный родопсии теряет способность к регенерации [2]. В результате происходит апонтоз и некроз фоторецепторных клеток. Наиболее опасным для зрительного аппарата является излучение в диапазоне 320 – 550 нм, что соответствует максимуму поглощения основных хромофоров [1, 11].

Существует мнение, что воздействие света играст определенную роль в старении сетчатки и возникновении старческой макулярной дегенерации [4]. Экспериментальное светоповреждение широко используется в исследовательской практике для воспроизведения некоторых патологий и дегенеративных заболеваний сетчатки, в частносги, пигментного регинита [6]. Нами поставлена задача получить приемлемую модель светоновреждения у беспородных белых крыс, а также исследовать и оценить морфологические изменения в различных отделах сетчатки, возникающие при светоповреждении.

Материал и методика. В эксперименте использовались белые беспородные крысысамки массой 150–180 г. находившиеся на обычном рационе со свободным доступом к воде. Животных содержали при освещенности 30–50 лк. Световое повреждение вызывали следующим образом. Крыс помещали в ящик из проэрачного органического стекла, разледенный на 4 отсека металлическими решетками (по одной крысе в каждый отсек). Был обеспечен постоянный доступ к воде и корму. Источинком света служили 4 люминесцентные лампы дневного света, мощностью 20 Вт. которые располагались снаружи ящика. 2 лампы на высоте 15 см от дна ящика и на расстоянии 7-8 см от боковых стенок, а две лямпы - на высоте 15 см от дна ящика и на расстоянии 7-8 см от боковых стенок, а две лямпы - на высоте 70 см от дна непосредственно над нерхним красм ящика. Освещенность внутри ящика составляла 2500 лк (измерено люкеметром Ю 116). Такое расположение дамп было выбрано с тем, чтобы облучение крыс было равномерным, и интенсивность повреждения не зависела от местоположения животного. Перед экспериментом крыс подвергали темновой адаптации в течение 12-14 ч. Затем следожала световая экспозиция в течение 24 или 48 ч. Температура воздуха внутри ящика в течение

облучения не превышала комнятную гемпературу и находилась в пределах 20±2°. По окончании световой экспознции животных помещали в клетки, где они содержались в обычных условиях. Крыс забивали на 10-й день путем улушения углекислым газом. За этим следоваля быстрая дскапитация и навлечение глазных яблох из глазниц-Для исследования брали только один глаз-Пренарирование глазных яблок состояла и разреданни по экваторнальной линии и удалении роговины, радужной оболочки, хрусталика и стекловидного тела. Полученные глазные бохады 10%-HOM фиксировали в формалине на бикарбонатном буфере (рН 7,2) в течение 20-22 ч. После соответствующей проводки образны заливали в парафии. Бокал резали на санном микротоме. МС-2 в вертикальном направлении (толщина срезов 10) 13 мкм), для исследования брались срезы. проходянине через диск зрительного нерва Срезы окрашивали эозином и гематоксилином Исследование срезов проводили на свстовом микроскопе (Carl Zeiss Jena, Nu = 1) при увеличениях х150 300 Морфомстрическую оненку проводили с помощью откалиброванной микрометрической насадки к микроскопу (Carl Zeiss



Рис. 1. Схематическое расположение квалронтов в глазном бокале ст 1262. дет - дейс

Jena), при увеличения x150, по модифицированной нами методике, предложенной La Vail с созвт. [8].

Всю сстчатку условно делили на 4 равных квадранта. Толшину НЯС измеряли отлельно в каждом квадранте (по S-6 измерений в каждом): в двух квадрантах, находящихся выше эрительного нерва (superior 1 superior 2), и двух квадрантах, находящихся ниже эрительного нерва (inferior 1, inferior 2) (рис. 1). Рассчитывали среднее арифметическое для каждого квадранта.

Замеры делали в среднем через каждые 300 мкм, одним замером измеряли участок длиной 100-150 мкм. Также оценивали состояние наружных сегментов фотореценторов.

Результаты и обсуждение. Белые крысы являются удобным объектом для подобного рода исследований из-за повышенной чувствительности их сетчатки к повреждающему действию света. Это обусловлено отсутствием пигментации в радужной оболочке и пигментном эпителии. а также преобладанием в сетчатке палочек, которые гораздо легче повреждаются от света, чем колбочки. Последние в сетчатке глаза крысы составляют 1,5% [3].

Одним из наиболее явных морфологических признаков светового повреждения является уменьшение толщины или исчезновение наружного ядерного слоя сетчатки (НЯС) [13].

Считается, что уменьшение толщины НЯС является количественным показателем дегенеративных изменений в фотореценторах [15].

Принято во внимание то, что способность фотореценторов к восстановлению задействована тогда, когда в повреждении затронуты голько наружные и внутренние сегменты, а при повреждении ядер фотореценторов изменения необратимы [10,14].



Рис. 2. Микрофотографии сетчаток. 1 - неповрежденная, нормальная сетчатка крысы. 2 - нентральная часть сетчатка крысы. после 48 ч сжетовой экспозиции. Заметно полное исчезновение слоев наружных и анутренних сетментов, а также наружного ядерного слоя, фактически полный некроз фотореценторов. 3 - центральная часть сетчатки. Наблодается полное исчезновение наружных и внутренных сетментов, а также наружного ядерного слоя, фактически полный некроз фотореценторов. 3 - центральная часть сетчатки. Наблодается полное исчезновение наружных и внутренанся сетментов, наружный ядерный слой представлен 1 – 3 слоями. Такая морфологическая картина больше харамтерна для 24-часовой экспозицие. 4 – периферическая часть сетчатки. Наружный ядерный слой незначительно утотчен. Вианы фрагменты наружных и внутренных сетментов.

Условные обозначения НС – наружные сегменты; ВС – внутренние сегменты: НЯС – нвружный язерный слой, ВЯС – внутренний идерный слой, ВСС – внутренний слой. СГК – слой ганглиозных клеток. Метка – 20 мкм.

В нормальной, неповрежденной сетчатке (рис. 2-1) слой наружных сегментов палочек ровный, располагается строго вертикально и очень плотный, зазоры между отдельными сегментами очень маленькие. Средняя толшина слоя - 31 мкм. Слой внутренних сегментов тоже плотный, располагается под небольшим наклоном, хорошо окрашивается в краснорозовый цвет, чем и отличается от слоя наружных сегментов, который менее контрастен. НЯС состоит из 7-9 рядов ядер, которые плотно прилегают друг к другу. Фотореневтгорная клетка имеет голько одно ядро, диаметр которого около 5 мкм.

И при 24- и при 48-часовой экспозициях при освещенности 2500 лк в сетчатках крыс, забитых на 10 лень, наблюдались глубокие деструктивные изменения в фотореценторных клетках. В первую очередь повреждаются наружные и внутренние сегменты, которые сильно укорачиваются, но чаще полностью исчезают. При более глубоких повреждениях наблюлалось уменьшение количества ядер в НЯС, что проявляется в изменении се толщины. Результаты замеров толщины наружного ядерного слоя в исследованных пренаратах представлены в табл. 1.

Квадрант	S, 27,7+3,9		S ₁ 33,4±4,9		32,5±3,5		1, 27.5±1.6	
Контроль n = 6								
2500 лк/48 ч п = 10	16.912.9	39	6.4±4.7	81 %	10.1±3,7	69%	16.813.4	39%
2500 лк/24 ч n 8	16,1±4,0	42 %	8,5±4,9	74 %	17,8±3,4	45 %	22+2,3	20 %

Таблина 1. Толщина наружного ядерного слоя сетчаток, мкм (M±m), у контрольной и опытных групп животных и лицамика изменения

Примечание: п = количество полечитанных образцов. Р<0.1

Согласно полученным данным, при экспозиции 48 ч толшина НЯС снижается на 75% в центральной части сегчатки (квадранты S., 1.) и на 39% в периферической ее части (S., 1.). При экспозиции 24 ч эти цифры соответствуют 60% и 31% по сравнению с толщиной НЯС в сетчансе необлученных крыс. При обоих режимах экспозиции картина изменений в центральной части сетчатки была идентичной. Сильнее всего поражался квадрант S,, при этом максимум поражения приходился на его центр. Наблюдалось полное исчезновение наружных и внутренних сегментов фоторецепторов, НЯС при этом представлен одним рядом ядер или полностью отсутствовал (рис. 2-2). Такая закономерность наблюдалась во всех исследованных прецаратах и при обоих режимах светоповреждения. Подобные изменения свидетельствуют о апоптозе фоторецепторов, и их регенерация в этом квадранте маловероятна. Полученные данные сходны с результатами других исследований [3, 15], в которых также показано, что при светоповреждении наиболее сильно поражается центральный верхний квадрант. Возможно, это обусловлено тем, что именно в центральную часть фокусируется большая часть световых лучей.

В центральном нижнем квадранте (1) слон наружных и внутренних сегментов чаще всего отсутствовали или были сильно укорочены. а НЯС состоял из 1-3, реже 4 рядов ядер (рис. 2-3).

На периферии деструктивные изменения выражены меньше. В целом характер изменений в квадрантах S, и L. при обоих режимах экспозиции совпадает. Нижний периферический квадрант значительно меньше подвержен дегенеративным изменениям, что более заметно при 24-часовой экспозиции. В периферических квадрантах НЯС состоял из 4-6 рядов ядер. Ближе к центру квадрантов заметны слои сильно укороченных наружных сегментов. (рис. 2-4). Лишь по краям сетчатки наблюдались участки с «нормальной» морфологической структурой.

Следует отметить некоторые морфологические особенности. Ядра располагались рыхло, межъядерные промежутки увеличены. Наружные сегменты при световом повреждении, если даже не укорачиваются, то сильно искривляются и слипаются друг с другом. Слои наружных и внутренних сегментов в поврежденной сегчатке сливаются и неразличимы, окраниваются одинаково неконтрастно. Чаше наружные сегменты укорачивались пропорционально уменьшению толшины НЯС, в других случаях толщина слоев ченялась непропорционально. Деструктивные изменения в низлежащих слоях сегчатки не выражены. Можно отметить лишь уголщение внутреннего синаптического слоя на тех участках, где фоторененторы полностью отсутствовали, что может быть результатом восналительного отека [13].

Для развития дегенеративных процессов необхолимо время. Так, при исследовании сетчаток крыс, забитых на 3-й день после облучения 2500 лк 48ч, заметных морфолотических изменении обнаружено не было. Примечательно только небольшое укорачивание наружных сегментов палочекнаблюдаемое в центральных квадрантах.

Таким образом, при освещенности 2500 лк и экспозиции 24 ч в сегчатке белых крыс возникают глубокие дегенеративные изменения, которы несколько усиливаются при 48-часовой экспозиции. Данная метолик светоповреждения и морфометрический метод его оценки можно применят лля моделирования дегенеративных процессов в сетчатке и изучени протективного действия различных веществ и лекарственных прецаратов.

ЛИТЕРАТУРА

- Каламкаров Г.Р., Островский М.А. Молекулярные механизмы эрительно: рецепции, М., Наука, 2002.
- 2. Островский М.А., Федорович И.Б. Биофизика, 39, 1, 13-25, 1994.
- Aonuma H., Yamazakia R., Watanabea I. Japanese Journal of Ophthalmology 43, 3, 171-179, 1999.
- Boulton M., Rozanowska M., Rozanowski B. J. Photochem Photobiol, B-Biology 64, 144-161, 2001.
- Borg D.C. Oxygen free radicals and tissue injury in Oxygen free radicals in tissue damage (eds. Tarr M. and Samson F.), Birkhauser, Boston, MA, 1993
- 6. Chambers M.L., Organisciak D., Darrow R., Barsalou I., Stepczynski J., McDonald B., Lagali P.S., Wilton B.L., Wong P.W. Invest Ophthalmol Vi

Sci, 41, 4, 2000.

- Fridovich I. Getting along with oxygen in Oxygen free radicals in tissue damage (eds. Tarr M. and Samson F.), Birkhauser, Boston, MA, 1993.
- 8. LaVail M.M., Unoki K., Yasumura D., Matthes M.T., Yancopoulos G.D., Steinberg R.H. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89, 11249-53, 1992.
- Moriya M., Backer B.N., Williams T.P. Cell Tissue Res., 246, 607-621, 1986.
 Rapp L.M., Smith S.C. Invest Ophthalmol Vis Sci., 33, 3367-3377, 1992.
 Reme C.E., Hafezi F., Marti A., Munz K., Reinboth J.J. Light damage to
- Reme C.E., Hafezi F., Marti A., Munz K., Reinboth J.J. Light damage to retina and retinal pigment epithelium, in M. Marmor, T. Wolfensberger (Eds.), The Retinal Pigment epithelium, Oxford University Press, Oxford, 1998.
- 12 Wyse J.P. Can. J. Ophthalmology 15, 15-19, 1980.
- 13. Zhang C., Lei B., Lam T., Yang F., Sinha D., Tsa M. Invest Ophthalmol Vis Sci., 45, 8, 2004.

Hoemynusa 13.11.2006