

Влияние экстракта черники кавказской (*Vaccinium arctostaphylos* L.) на морфологические изменения сетчатки крыс при фотоиндуцированном повреждении

Р.В. Степанян¹, А.В. Топчян¹, А.М. Петросян², Л. А. Погосян²

¹Кафедра технологии лекарств ЕрГМУ им. М. Гераци

²Институт биохимии им. Г.Х. Буниятына НАН РА

375025, Ереван, ул. Корюна, 2

Ключевые слова: черника кавказская, сетчатка, фотоиндуцированное повреждение, фоторецепторы

Природный парадокс зрения состоит в том, что сочетание света и кислорода, являясь необходимым условием для осуществления нормального фоторецепторного процесса, в некоторых случаях приводит к возникновению и развитию в структурах глаза деструктивных фотохимических реакций [2, 7]. Этот процесс получил название фотоиндуцированного повреждения.

В основе фотоиндуцированного повреждения сетчатки лежат процессы фотосенсибилизированного свободнорадикального окисления [2]. Свободные радикалы поражают полиненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав мембран клеток, белки, в частности родопсин, и ДНК, что приводит к дегенерации сетчатки [7].

Экспериментальное фотоповреждение является моделью окислительного стресса, который лежит в основе многих заболеваний сетчатки, в частности, старческой макулярной дегенерации [6]. В связи с этим значительную важность представляют изучение механизмов повреждающего действия света и поиск средств, оказывающих профилактический либо терапевтический эффект при этих повреждениях.

Одним из путей защиты от фотоповреждения является применение антиоксидантов, тормозящих процессы свободнорадикального фотосенсибилизированного окисления и усиливающих антиоксидантную систему сетчатки, например α -токоферол, аскорбиновая кислота [5, 6]. В этом смысле особенный интерес представляют растительные антиоксиданты, обладающие низкой токсичностью и высокой эффективностью. В последние годы в центре внимания исследователей находятся экстракты черники обыкновенной, которые, как было показано в ряде работ, обладают мощной антиоксидантной активностью, сила которой прямо пропорциональна количеству антоцианов [14]. В частности, в работах Jang et al. [9] на культуре клеток пигментного эпителия сетчатки было показано,

что экстракт черники обыкновенной обладает способностью угнетать фотоокислительные процессы в пигментном эпителии сетчатки. Все это позволяет сделать предположение, что экстракт черники может оказывать протективное влияние при фотоиндуцированном повреждении сетчатки.

В предыдущих исследованиях [4] нами была доказана правомочность применения в качестве лекарственного сырья плодов черники кавказской (*Vaccinium arctostaphylos* L.) наряду с плодами черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus* L.). Исходя из этого, в данном исследовании была поставлена цель изучить влияние экстракта черники кавказской на морфологические изменения сетчатки крыс при фотоиндуцированном повреждении.

Материал и методы

Получение экстракта черники кавказской

Измельченные плоды черники кавказской экстрагировали методом мацерации на водяной бане (40–43°C) в течение 3 ч, после чего настаивали при комнатной температуре 24 ч. Экстрагентом служил 70% этанол, подкисленный лимонной кислотой в концентрации 5,0 г/л [3]. Полученный экстракт сгущали с помощью ротационного вакуумного испарителя, после чего с целью стандартизации осуществляли количественное определение антоцианов методом рН-дифференциальной спектрофотометрии [8].

Лабораторные животные

В эксперименте использовались белые беспородные крысы в возрасте 5–6 мес., массой 180–200 г, находившиеся на обычном рационе вивария со свободным доступом к воде и содержащиеся в условиях освещенности 40–50 лк.

Животные были разделены на две группы: опытную и контрольную. Опытной группе животных в

течение 10 дней ежедневно перорально (с помощью зонда) вводили жидкий экстракт плодов черники кавказской в объеме 1 мл в сутки (доза мономерных антоцианов в пересчете на цианидина-3-гликозид - 20 мг/кг). Контрольные животные аналогичным образом получали дистиллированную воду в объеме 1 мл.

Затем у всех животных вызывали фотоиндуцированное повреждение сетчатки, предварительно подвергая темновой адаптации в течение 12–14 часов. После повреждения сетчатки, животных возвращали в виварий, где их содержали в обычных условиях в течение 10 дней. На 10-й день после экспозиции крыс забивали декапитацией в условиях предварительного наркоза (хлоралгидрат - 400 мг/кг внутривенно).

Экспериментальное фотоиндуцированное повреждение сетчатки

Фотоиндуцированное повреждение сетчатки крыс вызывали путем экспозиции животных белому люминесцентному свету в 2000–2200 лк (измерение с помощью люксметра Ю 116, Россия) в течение 24 ч. в камере из прозрачного органического стекла, разделенной с помощью металлических сеток на отдельные отсеки.

Освещенность внутри камеры обеспечивалась находящимися снаружи люминесцентными лампами дневного света мощностью 20 Вт, две из которых были расположены на высоте 15 см от дна камеры и на расстоянии 7–8 см от боковых стенок, две лампы - на высоте 70 см от дна непосредственно над прикрывающей камеру решеткой, что обеспечивает равномерное облучение крыс светом.

В течение эксперимента животные имели постоянный доступ к воде и корму. Температура воздуха внутри камеры находилась в пределах $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Приготовление глазных яблок и приготовление препаратов для гистологического анализа

После декапитации крыс глазные яблоки быстро извлекали и разрезали по экваториальной линии. Затем удаляли роговицу, радужную оболочку, хрусталик и стекловидное тело. Полученные глазные бокалы, состоящие из белочной, сосудистой оболочек и сетчатки фиксировали в 10% формалине на бикарбонатном буфере (рН 7.2) в течение 20–22 часов. После гистологической проводки через серию этанолов восходящей концентрации и пропитки, образцы заливали в парафин. Блоки резали на санном микротоме МС - 2 (Россия) в вертикальном направлении, а полученные срезы (толщиной 13 – 15 мкм) окрашивали эозином и гематоксилином и заключали в канадский бальзам. Для морфометрического исследования брали срезы, проходящие через диск зрительного нерва [1].

Морфологическое и морфометрическое исследование сетчатки

Исследование срезов проводили с помощью светового микроскопа (Биолам, ЛОМО, Россия) при увели-

чениях $\times 150$ – 300 . Срезы фотографировали цифровой камерой Kodak CX 7300 (Eastman Kodak Co., USA).

Морфометрическую оценку проводили с помощью откалиброванной микрометрической насадки к микроскопу (NU, Carl Zeiss Jena, Germany), при увеличении $\times 150$ по методике, предложенной La Vail et al. [11].

Всю сетчатку условно делили на 4 равные части - квадранты (рис. 1). При этом два квадранта находились выше зрительного нерва: superior 1 (S1) и superior 2 (S2), а два квадранта ниже: inferior 1 (I1) и inferior 2 (I2). Длина всего бокала составляла около 8 мм, а одного квадранта - 2 мм. Одним замером измерялся участок длиной около 100–150 мкм. Измерение проводили в среднем через каждые 300–350 мкм, по 5–6 измерений в каждом из квадрантов. Одновременно оценивали состояние наружных сегментов фоторецепторов.

Полученные данные представлены в виде $M \pm m$ (Standard Error). Статистическая достоверность данных оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента.



Рис. 1. Схематическое расположение квадрантов сетчатки: S2 - периферический верхний квадрант, S1 - центральный верхний квадрант, I1 - центральный нижний квадрант, I2 - периферический нижний квадрант

Результаты и обсуждение

Согласно литературным данным, при фотоиндуцированном повреждении сетчатки наблюдаются морфологические изменения, наиболее выраженными из которых являются разрушение и укорачивание наружных сегментов фоторецепторов (НСФ), а также уменьшение толщины наружного ядерного слоя сетчатки (НЯС), что является следствием разрушения ядер фоторецепторов. Необходимо отметить также, что реге-

Дегенерация фоторецепторных клеток возможна только при сохранных ядрах, а при разрушении ядер дегенерация фоторецепторов необратима [18], вследствие чего измерение толщины НЯС представляет собой достоверный количественный показатель дегенеративных изменений в сетчатке. Как известно, на 10-й день после экспозиции свету наблюдается максимальное развитие дегенеративных процессов [12, 15, 16], исходя из чего морфологические изменения сетчаток были определены нами именно в этот срок.

Результаты проведенных морфометрических измерений свидетельствуют, что в результате фотоиндуцированного повреждения во всех квадрантах сетчатки наблюдается статистически достоверное уменьшение толщины НЯС (рис. 2).

В норме НЯС сетчатки представлен 8–10 рядами ядер, имеет примерно равную толщину во всех квадрантах и лишь незначительно утоньшается на краях, граничащих с передней камерой глаза (рис. 3 А, В). Толщина НЯС в квадранте I2 составляет $30,8 \pm 2,1$ мкм, в квадранте I1 – $33,3 \pm 1,1$, в S1 – $34,2 \pm 2,5$, в S2 – $31,3 \pm 1,7$ мкм.

В условиях фотоиндуцированного повреждения НЯС центральной части сетчаток (квадранты S1 и I1) крысы контрольной группы частично разрушается и состоит из 4–6, иногда из 3 рядов ядер, а на периферии НЯС стабильно содержит 7–8 рядов ядер

(рис. 3 С, D). Толщина НЯС в среднем уменьшается на 34,5% по сравнению с нормой (рис. 2), составляя в квадранте I2 $20,8 \pm 1,4$ мкм, в квадранте I1 – $21,6 \pm 2,1$, в S1 – $18,7 \pm 1,5$, в S2 – $22,1 \pm 1,4$ мкм.

Как видно из полученных данных, повреждению наиболее подвержен верхний центральный квадрант (S1) сетчатки, где толщина НЯС по сравнению с нормой уменьшается в среднем на 44% (рис. 2). Эти данные были показаны также в других исследованиях [13] и, возможно, объясняются тем, что именно на этот участок сетчатки фокусируется большая часть световых лучей от боковых ламп камеры, а, как известно [10], верхний центральный квадрант сетчатки содержит на 47% больше родопсина, чем нижний центральный квадрант, что также может являться причиной максимальной выраженности дегенеративных изменений в квадранте S1.

Наряду с разрушением НЯС, в результате фотоповреждения было отмечено значительное укорачивание наружных сегментов фоторецепторов (рис. 3 С, D).

Одновременно было отмечено, что на некоторых участках сетчаток крыс из контрольной группы наблюдается аномальное удлинение наружных сегментов фоторецепторов при одновременном уменьшении толщины НЯС. На рисунке 4В заметны непропорциональные изменения наружных сегментов и НЯС. Толщина слоя НСФ почти в два раза превосходит толщину

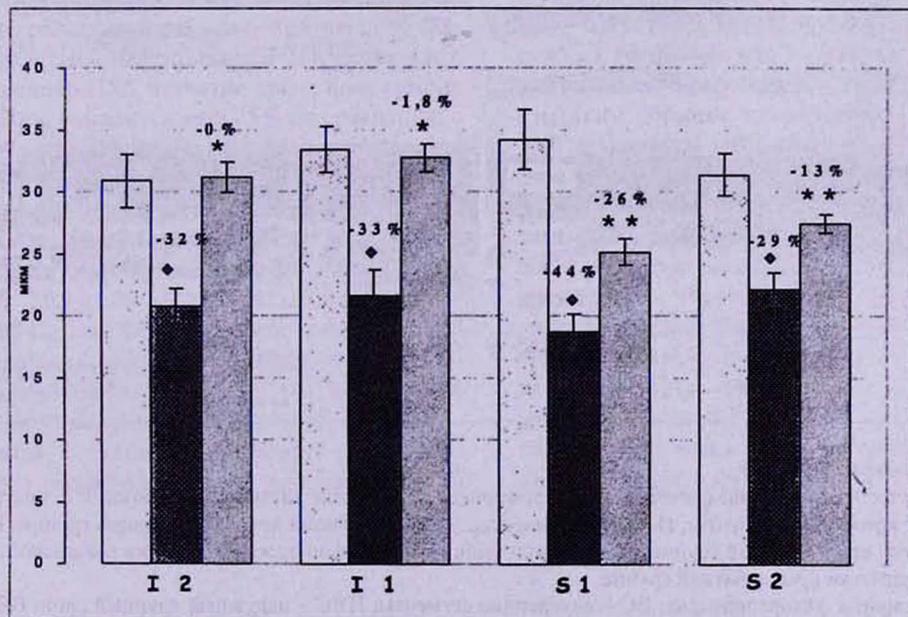


Рис. 2. Толщина наружного ядерного слоя в квадрантах сетчатки:

□ – крысы, не подвергавшиеся световой экспозиции (норма), $n=7$

■ – контрольные крысы, $n=9$

▒ – крысы, получавшие экстракт черники кавказской, $n=6$.

Проценты отражают уменьшение толщины НЯС по сравнению с нормой.

* $P < 0,0005$; ** $P < 0,01$ по отношению к контролю

◆ $P < 0,005$ по отношению к норме

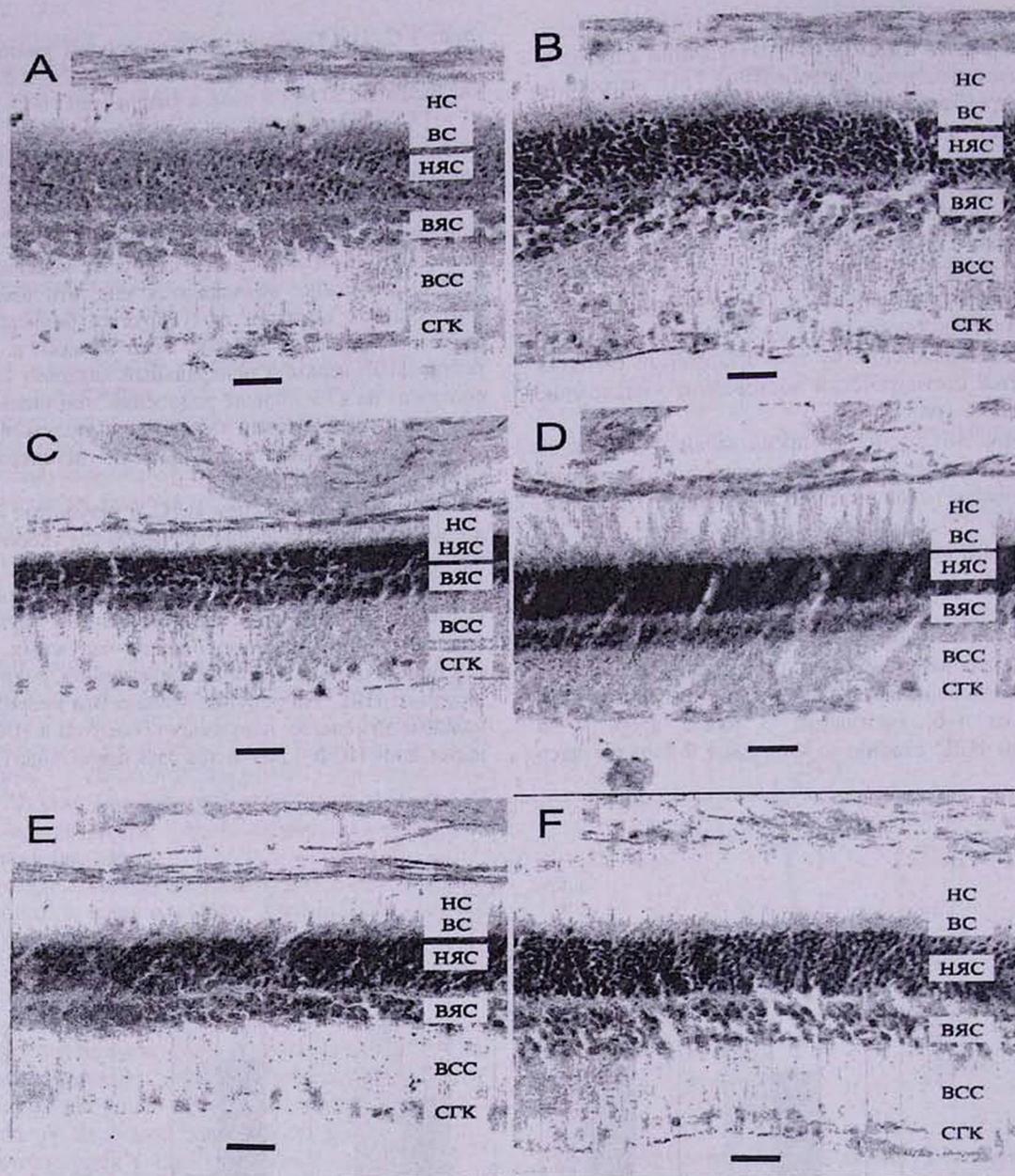


Рис. 3. Микрофотографии сетчатки:

А – центральный участок интактной сетчатки, В – периферический участок интактной сетчатки, С – центральный участок сетчатки крыс контрольной группы, D – периферический участок сетчатки крыс контрольной группы, Е – центральный участок сетчатки крыс опытной группы (крысы, получавших перорально экстракт черники кавказской), F – периферический участок сетчатки крыс опытной группы.

НС – наружные сегменты фоторецепторов; ВС – внутренние сегменты; НЯС – наружный ядерный слой; ВЯС – внутренний ядерный слой; ВСС – внутренний синаптический слой; СГК – слой ганглиозных клеток; метка – 20 мкм

ну слоя НЯС. Так, если в среднем длина НСФ у нормальных крыс составляет 35–40 мкм, то на вышеупомянутых участках толщина слоя НСФ составляет 45–47 мкм, а иногда даже более 50 мкм (рис. 4).

Данное явление, возможно, обусловлено нарушением функции пигментного эпителия сетчатки. Как известно, длинные микровиллы пигментного эпителия, находящиеся на его апикальной стороне окружа-

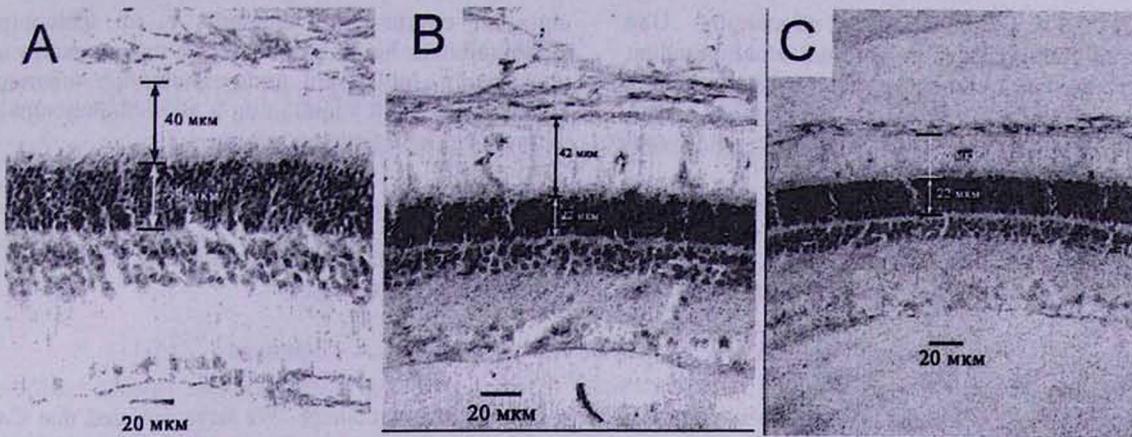


Рис. 4. Микрофотографии центрального нижнего квадранта сетчатки: А – участок интактной сетчатки; В, С – участки сетчатки крыс контрольной группы. Отмеченный верхний отрезок демонстрирует наружные сегменты, нижний – наружный ядерный слой

ют каждый НСФ и фагоцитируют верхние уже не функционирующие участки НСФ [17]. Возможно, аномальное удлинение наружных сегментов является результатом дисфункции поврежденного пигментного эпителия, который не в состоянии фагоцитировать верхние участки НСФ, в результате чего НСФ аномально удлиняются.

Морфометрические измерения сетчаток крыс, получавших экстракт черники, показали, что в центральных участках сетчатки животных, получавших экстракт черники, в НЯС насчитывается 7–8 рядов ядер. В среднем, толщина НЯС сетчатки крыс, получавших экстракт черники, снижается на 9,75% по сравнению с нормой. Наружные сегменты фоторецепторов при этом укорочены незначительно (рис. 3 Е, F).

Морфологические изменения наиболее выражены в верхнем центральном квадранте. Так, в сетчатках крыс, получавших чернику толщина НЯС в квадранте S1 составляет $25,1 \pm 1,05$ мкм, а в квадранте S2 – $27,4 \pm 0,75$ мкм, т.е. снижается соответственно на 26 и 13% по сравнению с нормой в отличие от контрольной группы, где снижение толщины НЯС в квадранте S1 составляет 44%, а в квадранте S2 – 29% (рис. 2).

В квадрантах сетчатки, находящихся ниже зрительного нерва морфологические изменения слабо

выражены, в отличие от контрольной группы (рис. 2). Так, средняя толщина НЯС в квадрантах I2 и I1 составляет $31,1 \pm 1,2$ мкм и $32,7 \pm 1,2$ мкм соответственно, что практически соответствует аналогичным показателям интактных сетчаток. Приведенные данные свидетельствуют о значительном протективном эффекте экстракта черники.

Одновременно необходимо отметить, что, согласно нашим наблюдениям, под влиянием экстракта черники отсутствует непропорциональное удлинение наружных сегментов, что является одним из проявлений протективного действия.

Таким образом, проведенное исследование позволяет заключить, что экстракт черники кавказской в дозе мономерных антоцианов 20 мг/кг при пероральном введении в течение 20 дней обладает способностью предотвращать развитие дегенеративных процессов в сетчатке, вызванных фотоиндуцированным повреждением. Протективный эффект проявляется в предотвращении разрушения слоя НЯС, а также в сохранении структуры наружных сегментов. Полученные результаты представляют собой определенную ценность, поскольку создают предпосылки для более глубокого изучения механизмов протективного действия экстрактов черники.

Поступила 06.12.06

Կովկասյան հապալասենու (*Vaccinium arctostaphylos* L.) հանուկի ազդեցությունը առնետների ցանցաթաղանթում լույսով հարուցված վնասման հետևանքով առաջացած մորֆոլոգիական փոփոխությունների վրա

Ռ.Վ. Սյրեփանյան, Ն.Վ. Թովիջյան, Ա.Մ. Պերրոսյան, Լ.Ա. Պողոսյան

Հայտնի է, որ լույսը և թթվածինը՝ լինելով նորմալ տեսողության մախապայմաններ, միաժամանակ

նպաստում են ցանցաթաղանթի վնասմանը: Մեր կողմից ուսումնասիրվել է կովկասյան հապալասենու պտուղների հանուկի ազդեցությունը ցանցաթաղանթի լուսային վնասման ժամանակ զարգացող դեստրուկտիվ փոփոխությունների վրա: Հետագո-

տության արդյունքում պարզվել է, որ կովկասյան հապալասենու հանուկը օժտված է պաշտպանիչ ազդեցությամբ, կանխելով ցանցաթաղանթի արտաքին կորիզային շերտի բարակումը և ֆոտոռեցեպտորների արտաքին սեգմենտների քայքայումը:

Influence of Caucasian bilberry (*Vaccinium arctostaphylos* L.) extract on morphological changes of rat retina under condition of light induced damage

R.V. Stepanyan, H.V. Topchyan, A.M. Petrosyan, L.A. Poghosyan

The retina represents a paradox, in that while light and oxygen are essential for vision, these conditions also lead to photochemical damage to the retina. The aim of this research is to assess the effect of Caucasian bilberry extract on morphological changes in rat retina in conditions

of light induced damage. We have revealed that Caucasian bilberry extract has strong protective property, which becomes evident in bilberry-treated rat retinae, preventing destruction of outer nuclear layer and outer segments of photoreceptors.

Литература

1. Коновский А.И. Гистохимия. Киев, 1976, с.44–64.
2. Островский М. А. Молекулярные механизмы повреждающего действия света на структуры глаза и системы защиты от такого повреждения. Успехи биологической химии, 2005, т. 45, с. 173–204.
3. Степанян Р. В. Разработка оптимальных условий экстрагирования антоцианов из плодов черники кавказской (*Vaccinium arctostaphylos* L.). Лекарство и медицина, 2006, 2. с. 53–59.
4. Топчян А.В., Ревазова Л.В., Степанян Р.В. Спектрофотометрическое и хроматографическое исследование плодов черники кавказской (*Vaccinium arctostaphylos* L.). Мед. наука Армении НАН РА, 2005, т. XLV, 2. с. 16–21.
5. Aonuma H., Yamazaki R., Watanabe I. Retinal Cell Death by Light Damage, Japanese Journal of Ophthalmology, 1999, 43, 3, p. 171–179.
6. Beatty S., Phil M., Henson D., Boulton M. The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration, Survey of Ophthalmology, 2000, 45, p. 2.
7. Boulton M., Rozanowska M., Rozanowski B. Retinal photo-damage. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2001, 64, p. 144–161.
8. Giusti M.M., Wrolstad R.E. Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In: R. E. Wrolstad (Ed.), Current Protocols in Food Analytical Chemistry. Unit F1.2.1-13 New York, 2001.
9. Jang Y.P., Zhou J., Nakanishi K., Sparrow J.R. Anthocyanins protect against A2E photooxidation and membrane permeabilization in retinal pigment epithelial cells, Photochem. Photobiol., 2005, 81(3), p. 529–536.
10. Rapp L.M., Naash M.I., Wiegand R.D., Joel C.D., Nielsen J.C., Anderson R.E. Morphological and biochemical comparison between retinal regions having differing susceptibility to photoreceptor degeneration. In: M.M. LaVail, J.G. Hollyfield and R.E. Anderson Editors. Retinal degeneration: experimental and clinical studies. Alan R. Liss, New York, 1985, p. 421–437.
11. LaVail M.M., Unoki K., Yasumura D., Matthes M.T., Yancopoulos G.D., Steinberg R.H. Multiple growth factor, cytokines and neurotrophins rescue photoreceptors from damaging effects of constant light, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1992, vol. 89, p. 11249–11253.
12. Li F., Cao W., Anderson R.E. Protection of photoreceptor cells in adult rats from light induced degeneration by adaptation to bright cyclic light, Exp. Eye Res., 2001, vol. 73, p. 569–577.
13. O'Steen W.K., Donnelly J.E. Chronologic analysis of variations in retinal damage in two strains of rats after short-term illumination, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1982, 22, p. 252–255.
14. Prior R., Cao G., Martin A., Sofic E., McEwen J., O'Brien C., Lischner N., Ehlenfeldt M., Kalt W., Krewer G., Mainland M. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of vaccinium species, J. Agric. Food Chem., 1998, 46, p. 2686–2693.
15. Reme C.E., Hafezi F., Marti A., Munz K., Reinboth J.J. Light Damage To Retina And Retinal Pigment Epithelium. In: The Retinal Pigment Epithelium (M. Marmor, T. Wolfensberger Eds.). Oxford University Press. Oxford, 1998, p. 563–586.
16. Wenzel A., Grimm Ch., Samardzija M., Reme Ch. E. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration, Prog. Ret. Eye Res., 2005, vol. 24, p. 275–306.
17. Wu J. Seregard S., Algever P. V. Photochemical damage of the Retina, Surv. Ophthalmol., 2006, 51, p. 461–481.
18. Wyse J.P. Renewal of rod outer segments following light-induced damage of the retina, Can. J. Ophthalmology, 1980,