

© Коллектив авторов, 2016  
УДК 617.735:616.8-008.615-053:599.323.4

*А.А.Нестерова<sup>1</sup>, В.В.Ермилов<sup>2</sup>, И.Н.Тюренков<sup>3</sup>, А.В.Смирнов<sup>4</sup>, Н.В.Григорьева<sup>4</sup>,  
В.Л.Загребин<sup>1</sup>, Л.Н.Рогова<sup>5</sup>, О.Н.Антошкин<sup>1</sup>, А.О.Довгалёв<sup>1</sup>*

## ХАРАКТЕРИСТИКА СЕТЧАТКИ ГЛАЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ СТРЕССЕ У ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

<sup>1</sup> Кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии (зав. — канд. мед. наук В.Л.Загребин); <sup>2</sup> кафедра судебной медицины (зав. — канд. мед. наук В.Б.Барканов); <sup>3</sup> кафедра фармакологии и биофармации, факультет усовершенствования врачей (зав. — чл.-кор. РАН проф. И.Н.Тюренков); <sup>4</sup> кафедра патологической анатомии (зав. — проф. А.В.Смирнов); <sup>5</sup> кафедра патологической физиологии (зав. — проф. Л.Н.Рогова), Волгоградский государственный медицинский университет

Исследована сетчатка глаза белых лабораторных крыс-самцов двух возрастных групп (12 и 24 мес) по 10 особей в каждой, подвергшихся хроническому комбинированному стрессу. Стрессирование животных вызывали одновременным воздействием пульсирующего света, громкого звука, покачивания и ограничения подвижности в течение 7 сут по 30 мин ежедневно. Контролем служила сетчатка глаза интактных крыс соответствующего возраста (n=20). Энуклеированные глаза стрессированных и контрольных животных подвергали стандартной гистологической обработке, срезы окрашивали по методу Ниссля и гематоксилином — эозином. Сетчатка глаза стрессированных животных обеих возрастных групп характеризовалась уменьшением количества клеток и нарушением упорядоченности её слоев, наиболее выраженным в слоях фоторецепторных нейронов и ганглиозных клеток. При морфометрическом анализе выявлено уменьшение толщины слоев и численной плотности клеток в сетчатке стрессированных как молодых (12 мес), так и старых (24 мес) животных по сравнению с таковой у контрольных животных.

**Ключевые слова:** сетчатка, стресс, морфометрический анализ

Возрастные изменения в тканях глаза подчиняются общим законам старения организма и, вместе с тем, имеют свои особенности, обусловленные структурно-функциональной спецификой зрительного анализатора [3, 12, 16].

Важнейшими причинами патологического старения и возникновения связанных с возрастом заболеваний являются нарушения приспособительных реакций при воздействии различных стрессорных факторов [4]. При старении снижается стресс-устойчивость — способность человека или животного переносить значительные неблагоприятные воздействия без вредных последствий для организма, что может рассматриваться как фактор, способствующий развитию возрастных заболеваний [4–6, 22]. Отмечена неодинаковая стресс-устойчивость у животных и людей в различных возрастных группах [22].

Повреждающее действие светового стрессора приводит к деструктивным изменениям сетчатки глаза человека и животных, гемодинамическим расстройствам, нарушениям ультраструктуры эндотелиоцитов и базальной мембраны капилляров, апоптозу нейронов ганглионарного слоя

[11, 20]. Работ с описанием морфологических изменений в сетчатке глаза при хроническом стрессорном воздействии в стареющем организме недостаточно для суждения об уровне стресс-устойчивости человека и животного к неблагоприятным воздействиям

Цель данного исследования — изучение структуры сетчатки глаза у молодых и старых крыс, подвергшихся хроническому комбинированному стрессу.

Материал и методы. Исследование проведено в соответствии с ГОСТом Р-534-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (1986), одобрено региональным независимым этическим комитетом (ГУ Волгоградский медицинский научный центр): протокол № 140-2011 от 11.06.2011 г.

Эксперименты проведены на аутбредных половозрелых крысах-самцах, полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово» РАМН и содержавшихся в стандартных условиях вивария с естественным 12-часовым светотемновым циклом при температуре воздуха 20±2 °С, влажности 60% при свободном доступе к воде и полноценному гранулированному корму (ГОСТ Р 50258-92). Стрессирование

### Сведения об авторах:

*Нестерова Алла Анатольевна, Загребин Валерий Леонидович (e-mail: vzagrebin@volgmed.ru), Антошкин Олег Николаевич, Довгалёв Андрей Олегович, кафедра гистологии, эмбриологии, цитологии; Ермилов Виктор Владимирович, кафедра судебной медицины; Тюренков Иван Николаевич, кафедра фармакологии и биофармации, факультет усовершенствования врачей; Смирнов Алексей Владимирович, Григорьева Наталья Владимировна, кафедра патологической анатомии; Рогова Людмила Николаевна, кафедра патологической физиологии, Волгоградский государственный медицинский университет, 400131, Волгоград, пл. Павших Борцов, 1*

животных вызывали путем комбинированного воздействия нескольких факторов в течение 7 сут по 30 мин ежедневно. Установка для стрессирования представляла собой камеру шириной 28×36×28 см<sup>3</sup>, разделенную на 6 изолированных отсеков (4×12×28 см<sup>3</sup>), закрепленную на наклонной плоской металлической платформе с углом наклона от 1 до 10°. Платформа оборудована электроприводом, совершающим качательные движения с частотой от 30 в 1 мин, имитирующие общую транспортно-технологическую вибрацию, передающуюся на тело живого объекта через опорные поверхности. Камера оснащена источником звукового шума (80 Дб) и тремя источниками света (20 Вт каждый), пульсирующими с периодом 2 с. Крыс помещали в изолированные отсеки и подвергали комбинированному или изолированному воздействию стрессоров: пульсирующий свет, громкий звук и покачивание. Ограничение подвижности, вызванное помещением крыс в тесные индивидуальные отсеки, служит дополнительным фактором, снижающим устойчивость к стрессу. Во время стрессирования температура внутри камеры повышалась на 7–8 °С, что обусловлено теплоотдачей животных, источниками света и работающим мотором установки. Смена температурных условий при помещении животных в установку и извлечении из неё также снижает стресс-устойчивость.

Действие стресса оценивали по развитию эрозивных и язвенных изменений в слизистой оболочке пищеварительного тракта, массе надпочечников и тимуса. Исследовали сетчатку глаз стрессированных крыс в возрасте 12 мес (молодые крысы, 1-я группа) и 24 мес (старые крысы, 2-я группа), а также двух контрольных групп того же возраста (интактные крысы — 3-я и 4-я группа), каждая группа включала по 10 особей. После энуклеации и осмотра глаз фиксировали в 10% забуференном растворе формалина, отмывали в проточной воде в течение нескольких часов, обезжировали в этаноле восходящей концентрации и заливали в парафин. Ориентировку глаза в парафиновом блоке осуществляли по методике В.Н. Архангельского [2]. С помощью ротационного микротомы готовили срезы толщиной 5 мкм, окрашивали гематоксилином — эозином, определяли толщину следующих слоев сетчатки: фоторецепторного (ФРС), наружного ядерного (НЯС), наружного сетчатого (НСС), внутреннего ядерного (ВЯС) и внутреннего сетчатого (ВСС). На 10 срезах, окрашенных по методу Ниссля, в 3–2 полях зрения при увеличении 400 у каждого животного определя-

ли численную плотность клеток (ЧПК) в НЯС и ВЯС [8]. ЧПК в НЯС определяли как количество клеток на площади 1100 мкм<sup>2</sup>, в ВЯС — на площади 250 мкм<sup>2</sup>. Толщину слоёв сетчатки измеряли в трех полях зрения (по 6 измерений) при увеличении 400.

Морфометрические показатели сетчатки оценивали с помощью камеры Tucsen is 1000 и программ (Image-Pro Plus, ImageJ и IScapture). Анализ данных проводили с использованием статистической программы Statistica 6.0 и U-критерия Манна—Уитни. Различия считали значимыми при  $P \leq 0,05$ .

**Результаты исследования.** Сетчатка глаза состоит из нейронов и глиальных клеток различных типов, образующих слои. Самый наружный слой сетчатки — пигментный эпителий у крысы представлен одним слоем низких столбчатых пигментцитов с центрально расположенными, ориентированными вдоль сетчатки овальными ядрами. Пигментный эпителий лежит на базальной мембране (мембране Бруха), которая граничит с сосудисто-капиллярной пластинкой сосудистой оболочки глаза. Под слоем пигментного эпителия располагается слой палочек и колбочек, демонстрирующий двуслойность соответственно наружным и внутренним сегментам фоторецепторных нейронов. Ядерные и сетчатые слои сетчатки 12-месячных контрольных крыс четко выражены. Плотны расположенные ядра нервных и глиальных клеток в ядерных слоях округлой формы интенсивно окрашиваются гематоксилином. У 24-месячных контрольных крыс обнаружено нарушение слоистости сетчатки: НСС выявлялся на отдельных участках, тела нейронов и глиальных клеток располагались дисперсно, нарушая характерную для сетчатки глаза у млекопитающих слоистость; в НЯС (рис. 1) местами наблюдалось уменьшение плотности расположе-

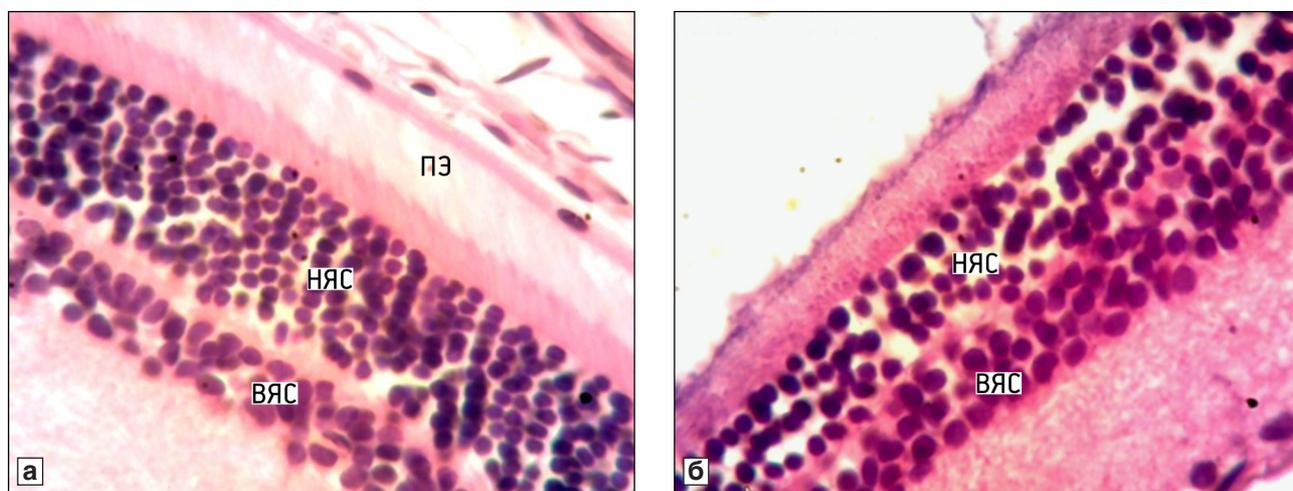


Рис. 1. Сетчатка глаза контрольных (интактных) крыс 12-месячного (а) и 24-месячного (б) возраста.

ВЯС — внутренний ядерный слой; НЯС — наружный ядерный слой; ПЭ — пигментный эпителий. Гематоксилин — эозин. Ув. 400

ЧПК НЯС и ВЯС сетчатки у старых крыс контрольной группы относительно ЧПК соответствующих клеток у молодых крыс контрольной группы составила 69 и 83% соответственно. Анализ морфометрических данных сетчатки у старых животных показал, что инволюционные изменения затрагивают все ее слои (рис. 2).

Сравнительный анализ морфометрических показателей сетчатки 12-месячных животных контрольной группы и стрессированных животных той же возрастной группы выявил уменьшение толщины ФРС на 18%, НЯС — на 31%, ВЯС — на 20%, НСС — на 50%, ВСС — на 25% ( $P \leq 0,01$ ). ЧПК и толщина ВЯС у экспериментальных животных составила 75%, толщина НЯС — 85% ( $P \leq 0,01$ ) от ЧПК и толщины тех же слоёв у контрольных животных (см. рис. 2).

У 24-месячных стрессированных животных в ВЯС наблюдалось снижение ЧПК по сравнению с таковой в НЯС, толщина ФРС значимо ( $P \leq 0,01$ ) уменьшилась на 34%, НЯС — на 64%, НСС — на 35%, ВСС — на 48%.

Морфометрический анализ сетчатки стрессированных 12-месячных и контрольных 24-месячных крыс показал уменьшение разницы в показателях, характеризующих количество клеток: ЧПК в НЯС и ВЯС сетчатки глаза у старых крыс контрольной группы относительно таковой у стрессированных молодых крыс составила 81 и 90% ( $P \leq 0,01$ ) соответственно. Уменьшение

толщины ФРС, НСС и ВСС в этой же группе (24-месячных крыс) по отношению к показателям у 12-месячных стрессированных крыс составило 15, 16 и 35% ( $P \leq 0,01$ ) соответственно.

Обсуждение полученных данных. Настоящее исследование свидетельствует о структурной трансформации стареющей сетчатки, что согласуется с результатами других авторов, полученными при исследовании трупного материала [3, 15, 16]. Эти изменения они связывают с нейродегенеративными процессами, которые проявляются структурной деформацией, гибелью клеток сетчатки, наиболее выраженной в слое фоторецепторных нейронов и ганглиозных клеток [7, 12, 21], что объясняется увеличивающейся метаболической активностью клеток пигментного эпителия, приводящей к накоплению липофуцина и различных белков, в том числе  $\beta$ -амилоида, сопровождающимся апоптотической гибелью фоторецепторов, метаболически и структурно зависимых от клеток пигментного эпителия [5, 9, 11].

Структурные преобразования сетчатки, возможно, связаны с дегенеративными процессами, сопровождающимися старением нервной ткани, находящейся в условиях постоянного фотодинамического напряжения и комбинированного стресса. В литературе широко обсуждаются причины, с возрастом приводящие к гибели нейронов сет-

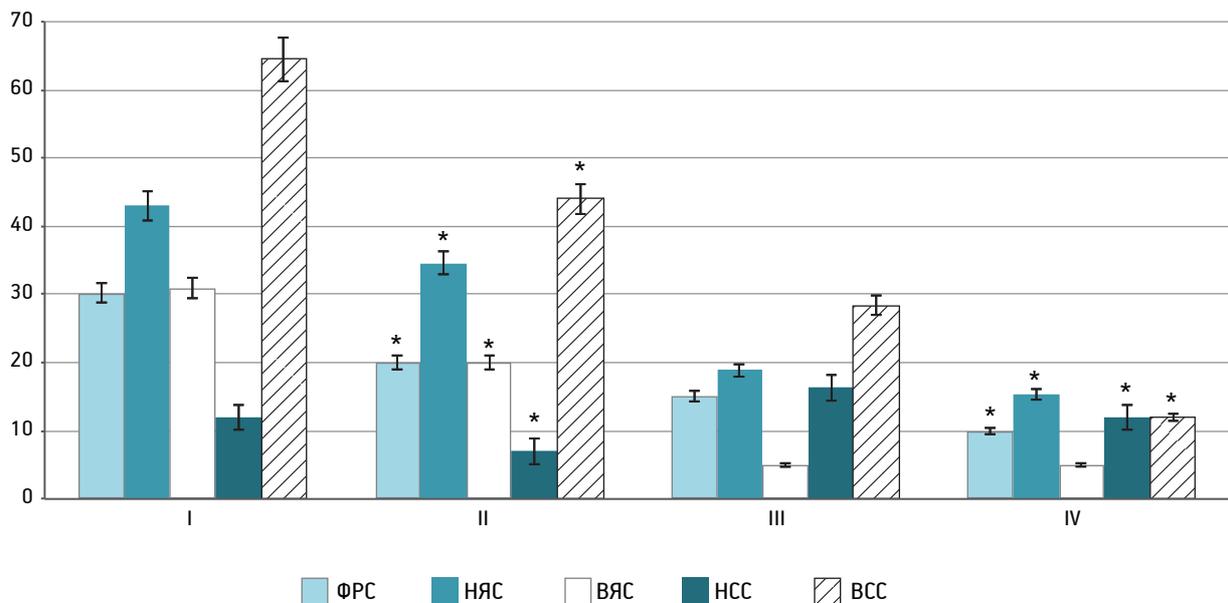


Рис. 2. Толщина слоев сетчатки глаза у контрольных (интактных) крыс и у подвергавшихся комбинированному стрессорному воздействию.

Слои сетчатки: ФРС — фоторецепторный; НЯС — наружный ядерный; ВЯС — внутренний ядерный; НСС — наружный сетчатый; ВСС — внутренний сетчатый. По оси абсцисс: 12-месячные крысы — I — контрольные, II — стрессированные; 24-месячные крысы — III — контрольные, IV — стрессированные; по оси ординат — толщина слоев сетчатки (мкм); \* различия по сравнению с показателем у животных контрольной группы того же возраста значимы при  $P \leq 0,01$ ; вертикальные отрезки — 95% доверительный интервал

чатки [1, 7]. Старение и возрастная патология ведут к снижению адаптации и остроты зрения, в патогенезе которых значительная роль отводится механизмам апоптоза [1, 10, 17]. Запуск программы, ведущей к смерти нейрона, как известно, может осуществляться цитокинами, гормонами, дериватами оксида азота, окисленными тиолами, продуктами модификации и последующей агрегации белков и нуклеиновых кислот [17–19]. Апоптотический механизм, несомненно, играет значительную роль в гибели фоторецепторов и ганглиозных клеток сетчатки, что подтверждается иммуногистохимически [1, 7, 15, 18, 19]. Используемый нами хронический комбинированный стресс со сменой разномодальных стрессоров (шум, вибрация, пульсирующий яркий свет) по стохастической схеме на фоне ограничения подвижности и повышающейся температуры окружающей среды вызывает у животных симптомы депрессивноподобного поведения, а также морфосоматические последствия: инволюцию тимуса и селезенки, гипертрофию надпочечников, изъязвления слизистой оболочки желудка [13]. Стрессорное мультифакторное воздействие, вероятно, усугубляет процессы, ведущие к развитию гибели клеток сетчатки. Более глубокие структурные изменения в сетчатке у старых крыс (24-месячных) по сравнению с таковыми у более молодых (12-месячных) можно объяснить снижением стресс-устойчивости и старением клеточных элементов сетчатки глаза. При сравнении морфометрических показателей сетчатки 12-месячных экспериментальных животных и 24-месячных контрольных животных обнаружено, что стресс-ассоциированная перестройка сетчатки у более молодых животных по морфометрическим показателям стремится к показателям у старых крыс контрольной группы и имеет менее выраженные различия по сравнению с различиями показателей у молодых — 12-месячных и старых — 24-месячных крыс контрольных групп, причем эта разница уменьшается по некоторым показателям в 3 раза и более, что, по-видимому, связано с ускорением нейродегенеративных процессов при стрессе [9, 11, 14, 19].

Таким образом, одним из основных проявлений, связанных со стрессом, является уменьшение ЧПК в ядерных слоях сетчатки. Проведенный морфометрический анализ сетчатки глаза старых и более молодых крыс показал, что морфологические изменения в ее слоях при комбинированном хроническом стрессорном воздействии и при старении имеют общий вектор, выражающийся в нейродегенеративных процессах. Показано, что микроструктура сетчатки глаза у стрессирован-

ных 12-месячных животных, согласно морфометрическим показателям, приближается к сетчатке старых — 24-месячных интактных крыс. Полученные данные позволяют сделать предположение о включении патогенетических механизмов ускоренного старения при длительном комбинированном стрессе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. СПб.: Наука, 2008.
2. Архангельский В. Н. Введение к микроскопическому исследованию глаза. М.: МГУ, 1957.
3. Борянова Н. В., Гончар П. А., Фролов М. А., Радыш Б. Б. Клиническая оценка некоторых структурных и функциональных изменений органа зрения в процессе старения // Клинический геронтолог. 2010. № 11–12. С. 70–72.
4. Гончарова Н. Д. Возрастные нарушения гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы: экспериментальные исследования на приматах // Успехи геронтолог. 2014. Вып. 2. С. 269–274.
5. Ермилов В. В., Махонина О. В. Роль локального амилоидоза тканей дна глаза в патогенезе геронтоофтальмологических заболеваний // Морфология. 2012. Т. 141, вып. 3. С. 97–98.
6. Ермилов В. В., Нестерова А. А., Тюренков И. Н. и др. Физиологическое старение сетчатки и ее пластичность // Вестн. Волгоградск. гос. мед. ун-та. 2013. № 2. С. 9–13.
7. Зуева М. В. Старение сетчатки // Росс. офтальмол. журн. 2010. № 2. С. 53–61.
8. Коржевский Д. Э. Основы гистологической техники. СПб.: СпецЛит, 2010.
9. Махонина О. В., Ермилов В. В. Межклеточные взаимодействия в программированной гибели клеток пигментного эпителия сетчатки и факторы, влияющие на амилоидогенез в структурах дна глаза больных возрастной макулярной дегенерацией // Астраханск. мед. журн. 2012. Т. 7, № 4. С. 176–179.
10. Проняева В. Е., Линькова Н. С., Трофимова С. В., Дьяконов М. М. Молекулярно-клеточные механизмы патологии сетчатки у людей разного возраста // Успехи геронтолог. 2012. Т. 25, № 2. С. 232–238.
11. Островский М. А. Молекулярные механизмы повреждающего действия света на структуры глаза и системы защиты от такого повреждения // Успехи биол. химии. 2005. Т. 45. С. 173–204.
12. Трофимова С. В., Хавинсон В. Х. Сетчатка и старение // Успехи геронтолог. 2002. Вып. 9. С. 79–82.
13. Тюренков И. Н., Филина И. С., Гумилевский Б. Ю. и др. Влияние иммунизации на адаптационные механизмы при хроническом стрессировании животных // Фундаментальные исследования. Волгоград: Волгоградск. гос. мед. ун-т, 2014. С. 368–371.
14. Bonilha V. L. Age and disease-related structural changes in the retinal pigment epithelium // Clin. Ophthalmol. 2008. Vol. 2. P. 413–424.
15. Curcio C. A., Millican C. L., Allen K. A. et al. Spare the rods save the cones in aging and age-related maculopathy. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2000. Vol. 41. P. 2015–2018.

16. Eliasieh K., Liets L.C., Chalupa L.M. Cellular reorganisation in the human retina during normal aging // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007. Vol. 48, № 6. P. 2824–2830.
17. El-Sayyad H.I., Khalifa S.A., El-Sayyad F.I. et al. Analysis of fine structure and biochemical changes of retina during aging of Wistar albino rats // *Clin. Exper. Ophthalmol.* 2014. Vol. 42. P. 169–181.
18. Guerin M.B., Donovan M., McKernan D.P. et al. Age-dependent rat retinal ganglion cell susceptibility to apoptotic stimuli: implications for glaucoma // *Clin. Exper. Ophthalmol.* 2011. Vol. 39, № 3. P. 243–251.
19. He Y., Tombran-Tink J. Mitochondrial decay and impairment of antioxidant defenses in aging RPE cells // *Adv. Exper. Med. Biol.* 2010. Vol. 664. P. 165–1683.
20. Narimatsu T., Ozawa Y., Miyake S. et al. Disruption of cell-cell junctions and induction of pathological cytokines in the retinal pigment epithelium of light-exposed mice // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2013. Vol. 54, № 7. P. 4555–4562.
21. Patel N.B., Lim M., Gajjar A. et al. Age-associated changes in the retinal nerve fiber layer and optic nerve head // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2014. Vol. 55, № 8. P. 5134–5143.
22. Pedersen W.A., Wan R., Mattson M.P. Impact of aging on stress-responsive neuroendocrine systems // *Mech. Ageing. Dev.* 2001. Vol. 122, № 9. P. 963–983.

Поступила в редакцию 17.05.2015

### CHARACTERISTICS OF THE RETINA IN CHRONIC STRESS IN LABORATORY RATS OF DIFFERENT AGE GROUPS

*A.A.Nesterova<sup>1</sup>, V.V.Yermilov<sup>2</sup>, I.N.Tiurenkov<sup>3</sup>,  
A.V.Smirnov<sup>4</sup>, N.V.Grigoriyeva<sup>4</sup>, V.L.Zagrebin<sup>1</sup>,  
L.N.Rogova<sup>5</sup>, O.N.Antoshkin<sup>1</sup>, A.O.Dovgalyov<sup>1</sup>*

The retina was studied in albino laboratory male rats of two age groups (12 and 24 months), 10 animals in each subjected to chronic combined stress. The stress was caused in animals by simultaneous exposure to pulsed light, loud sound, swinging and restriction of mobility for 7 days, 30 min daily. The retina of intact rats of the corresponding age groups (n=20) served as control. Enucleated eyes of stressed and control animals were processed with standard histological technique and stained with Nissl's method and hematoxylin—eosin. The retina of the stressed animals of both age groups showed the decrease in the number of cells and the disarrangement of its layers, most pronounced in the layers of photoreceptor neurons and ganglion cells. The comparative morphometric analysis demonstrated a reduction of the layer thickness and cell numerical density in the retina of stressed animals, both young (12 months) and old (24 months), as compared to that of control animals.

**Key words:** *retina, stress, morphometric analysis*

<sup>1</sup> Department of Histology, Embryology, Cytology; <sup>2</sup> Department of Forensic Medicine; <sup>3</sup> Department of Pharmacology and Biopharmaceutics, Postgraduate Medical Faculty; <sup>4</sup> Department of Pathological Anatomy; <sup>5</sup> Department of Pathological Physiology, Volgograd State Medical University