

© Коллектив авторов, 2011
УДК 617.735:616.831-005.4

*С.В. Логвинов¹, М.Б. Плотников², А.А. Жданкина¹, Г.А. Чернышева², В.И. Смольякова²,
И.С. Иванов², А.В. Кучин³, И.В. Чукичева³ и Е.Ю. Варакута¹*

СТРУКТУРНЫЕ НАРУШЕНИЯ ХОРОИДРЕТИНАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ГЛАЗА ПРИ ТОТАЛЬНОЙ ТРАНЗИТОРНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ИХ КОРРЕКЦИЯ

¹ Кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии (зав. — проф. С.В. Логвинов), Сибирский государственный медицинский университет; ² лаборатория фармакологии кровообращения (зав. — проф. М.Б. Плотников), Научно-исследовательский институт фармакологии СО РАМН, г. Томск; ³ лаборатория органического синтеза и химии природных соединений (зав. — чл.-кор. РАН проф. А.В. Кучин), Институт химии Коми Научного центра Уральского отделения РАН, г. Сыктывкар, e-mail: S_Logvinov@mail.ru

С помощью электронной микроскопии и морфометрического анализа изучены структурные изменения хороидоретинального комплекса глаза 40 взрослых белых беспородных крыс-самцов при тотальной транзиторной ишемии головного мозга и оценено влияние антиоксиданта класса экранированных фенолов диборнола. Показано, что тотальная транзиторная ишемия приводит к тромбозу капилляров сосудисто-капиллярной пластинки собственно сосудистой оболочки, структурным нарушениям гематоретинального барьера, дегенерации нейронов и радиальной глии сетчатки. Курсовое применение диборнола улучшает микроциркуляцию, оказывает защитное влияние на нейронный аппарат сетчатки, пигментный эпителий, радиальную глию.

Ключевые слова: сетчатка, острая ишемическая ретинопатия, тотальная транзиторная ишемия головного мозга, диборнол

В последние десятилетия острые сосудистые заболевания головного мозга занимают одно из лидирующих мест в структуре заболеваемости и смертности населения [5]. В ряде случаев, когда нарушения кровообращения затрагивают систему внутренней сонной и глазничной артерий, возникает угрожающее зрению состояние: глазной ишемический синдром, или острая ишемическая ретинопатия [2, 3]. Патоморфогенез ишемического повреждения сетчатки изучен достаточно подробно. Так, на различных моделях ишемии головного мозга (ИГМ) показано, что в сетчатке экспериментальных животных наблюдаются разрушение слоя палочек и колбочек, дегенерация радиальных глиоцитов с накоплением в них глиального фибриллярного белка, гибель амакринных, горизонтальных и ганглиозных нейронов как путем апоптоза, так и некроза, явления гемостаза и дилатации сосудов собственной сосудистой оболочки (ССО) [3, 9, 10]. Поскольку нервная ткань особо чувствительна к гиперпродукции свободных радикалов и окислительному стрессу, применение антиоксидантной терапии является патогенетически обоснованным при многих цереброваскулярных заболеваниях [8]. На сегодняшний день среди многочисленных классов антиоксидантных соединений одними из наиболее перспективных являются синтетические препараты на основе экранированных фенолов. Они способствуют уменьшению скорости перекисного окисления липидов

и белков, а также обладают антигипоксической и гемореологической активностью [4, 6, 7].

Цель настоящего исследования — изучение морфологических, в частности, ультраструктурных изменений хороидоретинального комплекса при острой ишемической ретинопатии в эксперименте и на фоне коррекции 4-метил-2,6-диизоборнилфенолом (диборнолом).

Материал и методы. Опыты выполнены на 40 беспородных крысах-самках массой 200–230 г. в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Ретинопротекторные эффекты диборнола оценивали на модели тотальной транзиторной ИГМ. Модель ИГМ у 30 крыс-самок воспроизводили по методу W.A. Pulsinelli и J.B. Brierley [11] под эфирным наркозом путем пережатия общих сонных артерий в течение 30 мин. За 1 сут до моделирования тотальной транзиторной ИГМ у наркотизированных крыс (этаминал-натрий 60 мг/кг) производили термокоагуляцию обеих позвоночных артерий на уровне I шейного позвонка. Состоятельность модели оценивали по побледнению радужки, расширению зрачков, развитию гипервентиляции. Реперфузию проводили снятием окклюдеров, после чего рану ушивали. Крысы группы сравнения (n=15) получали внутривенно 1 мл 1% крахмальной слизи, а животные подопытной группы (n=15) — диборнол в дозе 100 мг/кг в 1 мл крахмальной слизи 1 раз в сутки в течение 7 сут. Первое введение осуществляли через 1 ч после создания модели ишемии. Контрольную группу составили интактные животные (n=10), которых содержали в идентичных с экспериментальными условиях вивария. По завершении экспериментов крыс умерщвляли путем передозировки паров эфира.

Центральные участки задней стенки глаза фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида на 0,2 М какодильном буфере (рН 7,4), дополнительно фиксировали в 2% растворе четырехоксида осмия и заливали в смесь эпон и аралдита. Полутонкие срезы окрашивали толудиновым синим, ультратонкие — контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, просматривали и фотографировали в электронном микроскопе JEM-7A (Jeol, Япония). На полутонких срезах подсчитывали количество нейросенсорных клеток (НСК) с пикнозом ядра, пикноморфных ассоциативных нейронов и радиальных глиоцитов, ганглиозных нейронов с тотальным, очаговым хроматоллизом и измененных по темному типу. Определяли глионейрональный индекс — отношение числа радиальных глиоцитов к числу ассоциативных нейронов внутреннего ядерного слоя в 50 полях зрения в каждой сетчатке при об. 90, ок. 10. С помощью окулярной сетки Автандилова определяли численную плотность ядер в наружном ядерном слое на площади 1 мм², удельную площадь пигментного эпителия сетчатки, удельную площадь сосудов ССО — и с явлениями сладжа, стаза и тромбоза. Для оценки значимости различий при сравнении средних величин использовали непараметрический критерий Манна—Уитни.

Результаты исследования. У крыс с тотальной транзиторной ИГМ большинство сосудов ССО спазмированы, в строме отмечается появление большого числа фибробластоподобных отростчатых клеток, коллагеновых волокон. В части капилляров отмечаются явления гемолиза эритроцитов. Количественный анализ сосудов ССО показал статистически значимое увеличение удельной площади тромбированных сосудов со стазом, сладжем форменных элементов или тромбозом в 6,4 раза и снижение удельной площади открытых сосудов в 7,8 раза (таблица). Имеются структурные изменения гематоретинального

барьера: неравномерное утолщение и расслоение базального комплекса, сглаживание складчатости базальной пластинки (рис. 1), а также повышение электронной плотности цитоплазмы эндотелиоцитов, их вакуолизация. При этом наблюдаются значимое снижение удельной площади пигментного эпителия на срезе по сравнению с таковой в контроле на 30% (см. таблицу) и деструкция микроворсинок пигментоцитов. В цитоплазме пигментоцитов содержатся крупные вакуоли с фрагментами наружных сегментов НСК, мембранные диски которых имеют признаки деструкции — расслоение, склеивание и дезориентацию (рис. 2). Эти же изменения обнаруживаются и в слое палочек и колбочек. Внутренние сегменты относительно сохранены, однако в них отмечаются отек и разрушение крист митохондрий. Изменения ядро-содержащей части НСК представлены, главным образом, отеком перикариона, пикнозом и сморщиванием ядер (рис. 3; 4, а). Между телами НСК располагаются отечные и гипертрофированные отростки радиальных глиоцитов, которые фагоцитируют деструктивно измененные нейроны, внедряясь в них своими отростками (см. рис. 4, б). Количество пикноморфных НСК возрастает в 11 раз, что сопровождается значимым снижением численной плотности и количества рядов ядер НСК на 30 и 27% соответственно (см. таблицу).

Радиальная глия подвергается как прогрессивно-пролиферативным, так и деструктивным изменениям. В пользу первого утверждения свидетельствует упомянутая выше гипертрофия и пролиферация отростков радиальных глио-

Характеристика хориодоретинального комплекса глаза крыс с тотальной ишемией головного мозга ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Исследованные показатели	Группы животных		
	Контрольная (интактные крысы)	Группа сравнения (ишемия)	Подопытная (ишемия +диборнол)
Удельная площадь, %:			
открытых сосудов собственно сосудистой оболочки (ССО)	36,0±0,7	4,6±0,7*	5,2±0,7*
сосудов ССО со сладжем эритроцитов и тромбозом	1,52±0,09	9,6±1,2*	7,5±0,9* ⁺
пигментного эпителия	5,42±0,10	3,8±0,4*	4,2±0,5*
Доля нейросенсорных клеток (НСК) с пикнотизированными ядрами, %	0,203±0,021	2,2±0,3*	0,49±0,06* ⁺
Численная плотность ядер НСК на 1 мм ² среза	35 990±452	26 420±1614*	33 589±768 ⁺
Количество рядов ядер НСК в наружном ядерном слое сетчатки	13,1±0,4	9,2±0,4*	9,12±0,18*
Относительное содержание пикноморфных радиальных глиоцитов, %	2,1±0,3	7,2±0,9*	3,1±0,5 ⁺
Глионейрональный индекс	0,372±0,006	0,277±0,023*	0,34±0,04

* Различия по сравнению с контролем значимы при P<0,05.

⁺ Различия между показателями в группе без коррекции и на фоне лечения диборнолом значимы при P<0,05.

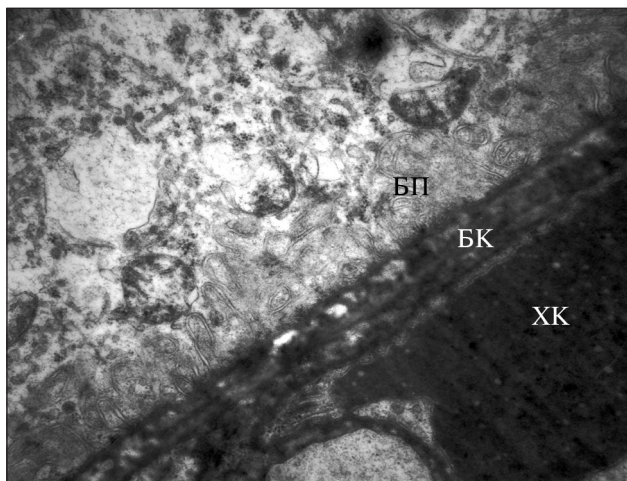


Рис. 1. Деструкция гематоретинального барьера у крыс с тотальной ишемией головного мозга.

Тромбоз хороидокапилляра (ХК), утолщение и разволокнение базального комплекса (БК), сглаживание складчатости базальной пластинки (БП) пигментного эпителия. Ув. 3500.

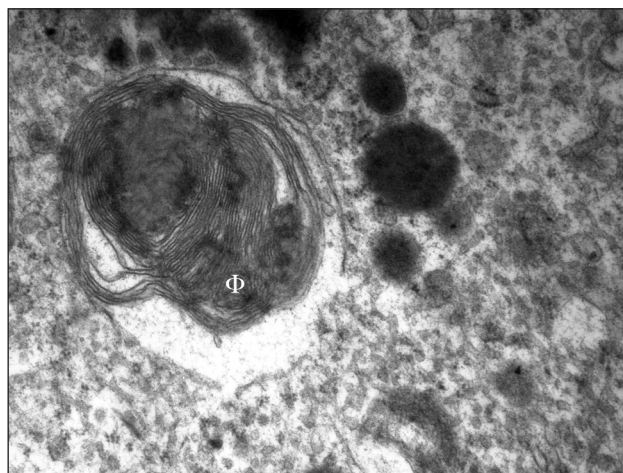


Рис. 2. Фагосома (Ф) с фрагментом мембранных дисков наружного сегмента нейросенсорной клетки в цитоплазме пигментной клетки в сетчатке крысы с тотальной ишемией головного мозга.

Ув. 4500.

цитов в наружном ядерном слое. Деструктивные изменения касаются в основном ядер глиоцитов, часть из которых характеризуются повышенной электронной плотностью, цитоплазма около ядра отечна, лишена органелл, в ней встречаются миелоноподобные тельца (см. рис. 3, 5). Судя по результатам количественного анализа в сетчатке глаза крыс с ИГМ, происходит значимое увеличение доли пикноморфных радиальных глиоцитов в 3,4 раза и снижение глионейронального индекса в 1,32 раза. Изучение ультраструктуры нейронов внутренних слоев сетчатки позволило выявить в части из них реактивные и деструктивные изменения. Так, встречаются биполярные нейроны с отеком цитоплазмы, деструкцией крист митохондрий, расширением цистерн эндоплазматической сети, погибшие нейроны (клетки-тени) (см. рис. 3). В ганглиозных нейронах отмечается очаговое растворение хроматофильного вещества, отек митохондрий с деструкцией крист. Количественный анализ нейронов внутренних слоев сетчатки глаза крыс контрольной группы показал значимое увеличение доли ганглиозных нейронов с очаговым и тотальным хроматолизом (см. рис. 3).

Применение диборнола с первых часов развития тотальной ИГМ существенно снижает негативные последствия гипоксии в сетчатке. Так, под влиянием препарата удельная площадь сосудов со стазом, сладжем или тромбозом уменьшается по сравнению с таковой в группе без введения диборнола на 22% ($P < 0,05$), однако удельная площадь открытых сосудов имеет лишь тенденцию к увеличению (см. таблицу). Наиболее существенное влияние исследуемый препарат оказывает на сохранность НСК, ганглиозных нейронов и ради-

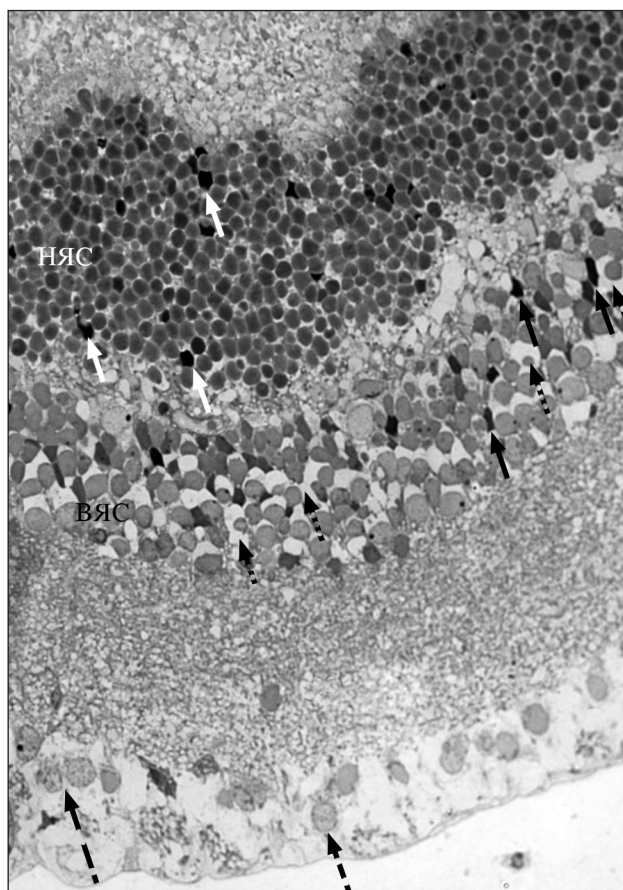


Рис. 3. Сетчатка глаза крысы с тотальной транзиторной ишемией головного мозга.

Пикнотизированные ядра нейросенсорных клеток (белые стрелки) в наружном ядерном слое, пикноморфные радиальные глиоциты (черные стрелки) и отек ассоциативных нейронов (стрелки с пунктиром) внутреннего ядерного слоя, очаговый хроматолиз ганглиозных нейронов (стрелки со штриховкой). Полутонкий срез. Окраска толуидиновым синим. Ув. 400.

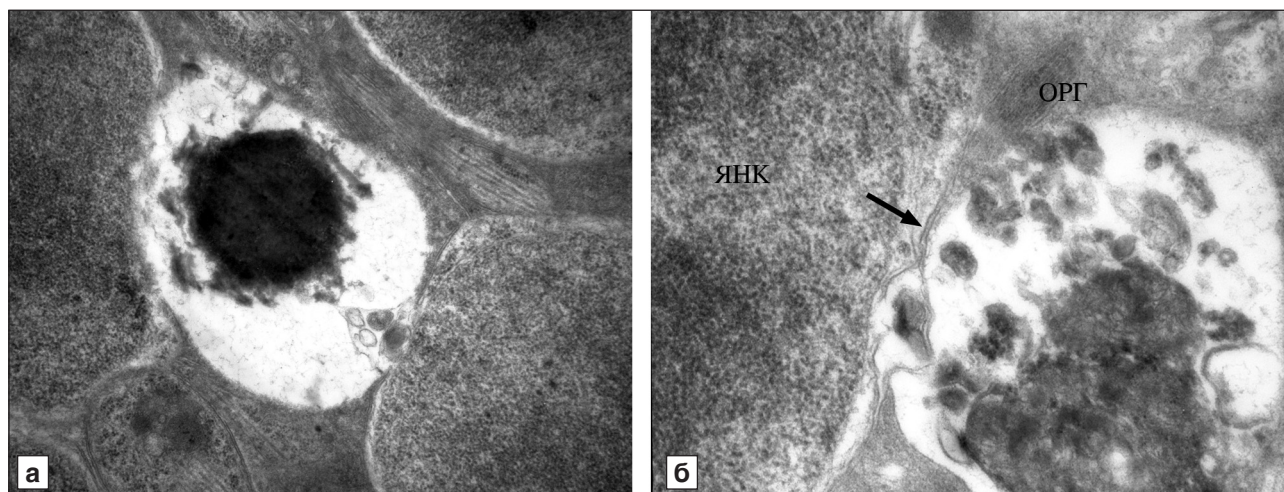


Рис. 4. Изменения наружного ядерного слоя сетчатки глаза крысы с тотальной ишемией головного мозга.

а — отек перикариона, пикноз нейросенсорной клетки; б — фагоцитоз отростками радиального глиоцита (ОРГ) деструктивно измененного перикариона нейросенсорной клетки (стрелка); ЯНК — ядро нейросенсорной клетки. Ув.: а — 2000; б — 5000.

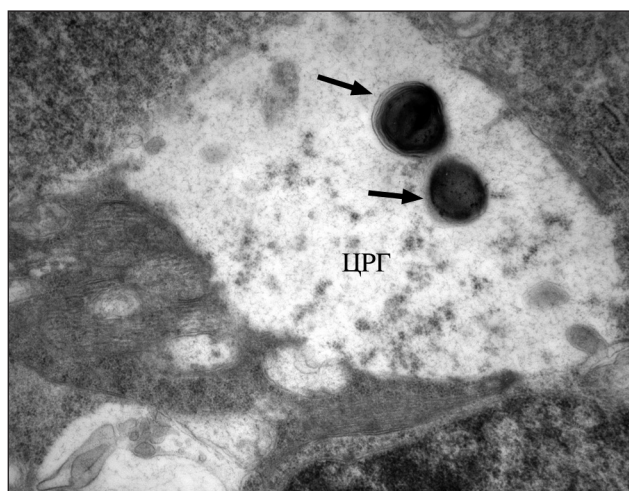


Рис. 5. Отек цитоплазмы радиального глиоцита (ЦРГ) в сетчатке глаза крысы с тотальной ишемией головного мозга.

Стрелки — миелиноподобные тельца. Ув. 2000.

альных глиоцитов. Снижается содержание НСК с пикнотично измененными ядрами в 4,5 раза, и увеличивается численная плотность ядер НСК на 21% по сравнению с таковыми в подопытной группе животных с ИГМ (см. таблицу). Доля пикноморфных радиальных глиоцитов при этом не превышала контрольных значений (см. таблицу).

Обсуждение полученных данных. В патогенезе острой ИГМ лежит нарушение потребления кислорода и глюкозы, приводящее к развитию ишемического каскада, включающего в себя внутриклеточный ацидоз, глутаматную токсичность, увеличение концентрации внутриклеточного кальция, синтез оксида азота и образование свободных радикалов [2, 5]. Перечисленные

механизмы в условиях тотальной ИГМ, учитывая общность происхождения и системы кровоснабжения, характерны и для сетчатки глаза [1]. Это нашло подтверждение в проведенных нами исследованиях. Пусковым механизмом в развитии дегенерации сетчатки при тотальной ИГМ являются сосудистые нарушения. Известно, что 85% всего кровотока в сетчатке осуществляется через капилляры ССО. Прекращение кровоснабжения приводит к спазму более крупных ее сосудов, застойным явлениям в капиллярном русле, нарушению ультраструктуры сосудистой стенки, что способствует развитию тромбоза, снижая шансы возобновления нормального кровотока после реперфузии. Развитие внутриклеточного отека отмечено как во всех типах нейронов, так и в радиальных глиоцитах. Дегенерация НСК, пигментного эпителия, ганглиозных нейронов и радиальных глиоцитов — клеток, богатых мембранными органеллами, свидетельствует, вероятно, о повреждающем действии свободных радикалов. При этом развивается первый порочный круг: поражение пигментного эпителия приводит к снижению фагоцитоза мембранных дисков и выработки ферментов антиоксидантной защиты (супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы), что усугубляет повреждение сетчатки [8]. Деструктивные изменения радиальных глиоцитов, вероятно, формируют еще один порочный круг путем накопления больших количеств нейромедиатора глутамата, нарушения метаболизма нейронов и запуска процессов, ведущих к гибели клеток преимущественно по пути некроза [2]. Таким образом, проведенное исследование показало, что при тотальной транзиторной ИГМ изменения сет-

чатки имеют отчетливо выраженный деструктивный характер. На первый план выступают тромбоз капилляров ССО, структурные нарушения гематоретинального барьера, деструкция мембранных дисков и ядродержащей части НСК в виде пикноза и рексиса, хроматолитические изменения ганглиозных нейронов, отек радиальных глиоцитов с последующей гибелью путем некроза.

Диборнол — синтетический антиоксидант из группы экранированных фенолов, дает значительный нейропротекторный эффект, существенно снижая дегенерацию НСК и ганглиозных клеток, что объясняется, вероятно, главным образом прямым антиоксидантным действием [4]. Выявленное нами положительное влияние диборнола на состояние микроциркуляторного русла за счет снижения удельной площади тромбированных сосудов ССО, по-видимому, связанное с антитромботической, антитромбогенной и гемореологической активностью препарата, способствует снижению гипоксии сетчатки, большей сохранности пигментного эпителия, радиальной глии и улучшению глионейрональных взаимодействий.

ЛИТЕРАТУРА

- Гундорова Р.А., Швецова Н.Е., Иванов А.Н. и др. Модель ишемии сетчатки: клинично-функциональное и гистологическое исследование. Вестн. офтальмол., 2008, № 3, с. 14–19.
- Гусев Е.И. и Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. М., Медицина, 2001.
- Древаль, А.А., Егоров Е.А., Кадырова М.Х. и др. Сравнение нейропротекторных свойств ретиналамина и эмоксипина. Рус. мед. журн., 2004, т. 5, № 3, с. 108–112.
- Иванов И.С. и Смольякова В.И. Влияние производного о-изоборнлфенола на показатели перекисного окисления липидов в тканях головного мозга при ишемии у крыс. В кн.: Науки о человеке: материалы IX конгресса молодых ученых и специалистов. Томск, изд. СибГМУ, 2008, с. 111–112.
- Инсульт: диагностика, лечение, профилактика. Под ред. З.А. Суслиной и М.А. Пирадова. М., МЕДпресс-информ, 2008.
- Озерова И.Б. Новые антиоксиданты — экранированные фенолы как модуляторы активности ацетилхолинэстеразы in vivo и in vitro: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2000.
- Плотников М.Б., Чернышева Г.А., Смольякова В.И. и др. Нейропротекторные эффекты диборнола и механизмы действия при ишемии головного мозга. Вестн. РАМН, 2009, № 11, с. 12–17.
- Федин А.И. Оксидантный стресс и применение антиоксидантов в неврологии. Нервные болезни, 2002, № 1, с. 15–19.
- Kaja S., Yang S., Wei J. et al. Estrogen protects the inner retina from apoptosis and ischemia-induced loss of vesl-1L/homer 1c immunoreactive synaptic connections. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2003, v. 44, p. 3155–3162.
- Stelle E.C. Jr., Guo Q., Namura S. et al. Filamentous middle cerebral artery occlusion causes ischemic damage to the retina in mice. Stroke, 2008, v. 39, p. 2099–2104.
- Pulsinelli W.A. and Brierley J.B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. Stroke, 1979, v. 10, № 3, p. 267–272.

Поступила в редакцию 17.02.2010
Получена после доработки 08.06.2011

STRUCTURAL CHANGES OF EYE CHORIORETINAL COMPLEX AFTER TOTAL CEREBRAL ISCHEMIA AND THEIR CORRECTION

S.V. Logvinov, M.B. Plotnikov, A.A. Zhdankina,
G.A. Chernysheva, V.I. Smolyakova, I.S. Ivanov,
A.V. Kuchin, I.V. Chukichyova and Ye.Yu. Varakuta

Structural changes of eye chorioretinal complex were investigated in 40 adult male outbred albino rats after total transient cerebral ischemia using electron microscopy and morphometric analysis. Furthermore, the influence of a new sterically hindered phenolic antioxidant dibornol on these processes was estimated. Our studies demonstrated that total transient cerebral ischemia in rats resulted in the capillary thrombosis of the choriocapillary lamina of the uvea, structural disturbances of the blood-retinal barrier, degeneration of the retinal neurons and radial glia.

Course administration of dibornol was shown to improve the microcirculation and to protect the retinal neuronal structures, pigment epithelium, and radial glia.

Key words: retina, chorioretinal complex, acute ischemic retinopathy, total transient cerebral ischemia, dibornol

Department of Histology, Embryology and, Cytology, Siberian State Medical University, Tomsk; Laboratory of Circulation Pharmacology, RAMS Siberian Branch Scientific Research Institute of Pharmacology, Novosibirsk; Laboratory of Organic Synthesis and Natural Compounds, Institute of Chemistry, RAS Ural Branch Komi Scientific Center, Syktyvkar