

УДК 617.735-001.15:612.843.42

РОЛЬ СОСУДИСТЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРИ ФОТОИНДУЦИРОВАННОМ ПОРАЖЕНИИ СЕТЧАТКИ

Варакута Е.Ю., Логвинов С.В., Потапов А.В., Жданкина А.А.,
Герасимов А.В., Аникина Е.Ю., Свердева Ю.О.

ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрова России,
Томск, e-mail: varelen@rambler.ru

С помощью методов световой и электронной микроскопии изучали сосудистые изменения хориоретинального комплекса при световом воздействии интенсивностью 6000 лк на 40 белых беспородных крысах-самцах. Забор материала производили на 1, 7, 14, 30 сутки после освещения. В аналогичные сроки забирали материал у контрольной группы, которую содержали в идентичных условиях вивария. Морфологические изменения эндотелиоцитов хориокапилляров характеризовались отеком цитоплазмы, вакуолизацией оргanelл, разволокнением базальной мембраны. Часть эндотелиоцитов подвергалась деструктивным изменениям, что усиливало нарушения гемодинамики. Так, удельная площадь сосудов хориоидеи со стазом, сладжем и тромбозом на 7-е сутки достоверно увеличивалась в 16 раз по сравнению с контролем ($p < 0,05$), площадь открытых сосудов снижалась в 4,3 раза (контроль $36 \pm 0,69$; $p < 0,05$). Прогрессирующее снижение удельной площади функционирующих сосудов приводило к нарушению перфузии и ишемии наружных слоев сетчатки, что сопровождалось их очаговым выпадением и стимулировало неоангиогенез, вызвавший вторичные дегенеративные изменения сетчатки.

Ключевые слова: сетчатка, хориоидея, световое повреждение

THE ROLE OF VASCULAR CHANGES FROM PHOTOINDUCED RETINAL DAMAGE

Varakuta E.Y., Logvinov S.V., Potapov A.V., Zhdankina A.A., Gerasimov A.V.,
Anikina E.Y., Sverdeva Y.O.

Siberian State Medical University, Tomsk, e-mail: varelen@rambler.ru

The vascular changes in the chorioretinal complex from light exposure with 6000 lux intensity were studied in 40 white outbred male rats using light and electron microscopy. The objects were extricated on the 1st, 7th, 14th, 30th day after the exposure. At the same time the extrication of the retinas was performed on the control group which had been kept in the same terms of vivarium. The morphological changes of the endothelial cells of the choroid capillaries found are as follows: the swelling of cytoplasm, vacuolation of organelles, fiber destruction of the basement membrane. Some of the endothelial cells were prone to destruction, which increased hemodynamic instability. The total area of choroid capillaries showing stasis, sludge, thrombosis was 16 times as big compared to the control group ($p < 0,05$) on the 7th day, while the total area of unaffected choroid capillaries decreased 4,3 times (control group; $p < 0,05$). The progressive decline of the area of functioning capillaries led to perfusion disorder and ischemia of the outer retinal layers, accompanied by their uneven loss. It stimulated neoangiogenesis, which induced secondary degenerative retinal changes.

Keywords: retina, choroid, photoinduced damage

Известно, что световое воздействие вызывает поражение всех клеточных элементов сетчатки [2, 3], механизм которого связан с фотоокислением мембранных структур [4, 8]. Тяжесть поражения сетчатки во многом зависит от степени расстройства микроциркуляции, так как сетчатка, являясь представителем нервной ткани, чувствительна к гипоксии. Постоянный и непрерывный приток глюкозы и кислорода из кровеносного русла является необходимым условием энергетического обеспечения нервных клеток. Даже при кратковременной гипоксии в нервной ткани резко падает образование АТФ, следствием чего является быстрое развитие необратимых изменений в ткани мозга [1].

Цель исследования – изучение морфологических изменений сосудистых элементов сетчатки и их вклада в развитие процес-

сов деструкции и репарации сетчатки при высокоинтенсивном световом воздействии.

Материал и методы исследования

Эксперименты проведены на 40 белых беспородных половозрелых крысах-самцах массой 200–250 гр. На крыс экспериментальной группы (20 животных) воздействовали в течение 6 час. белым светом, имеющим максимум излучения в желто-зеленой области спектра. Для облучения использовалась специальная установка из прямоугольных рефлекторов с вмонтированными в них люминесцентными лампами ЛБ-40, освещающая клетку с пяти сторон. Освещенность животных составляла 6000 лк. Контрольная группа ($n = 20$) – интактные животные, содержащиеся в условиях искусственного светового режима (12 часов в день, 12 часов в ночь), с интенсивностью дневного освещения 25 лк. Материалом исследования служили сетчатки крыс, изъятые сразу после их умерщвления под эфирным наркозом через 1, 7, 14 и 30 суток после освещения, в аналогичные сроки производили взятие контрольного материала.

Центральные участки задней стенки глаза фиксировали в растворе, содержащем смесь 4% параформальдегида и 0,5% глутаральдегида на 0,2 М какодильном буфере (pH 7,4). Материал постфиксировали в 2% растворе четырехоксида осмия и заливали в эпон. Полутонкие срезы окрашивали толуидиновым синим, ультратонкие – контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, просматривали и фотографировали в электронном микроскопе JEM-7 А. На полутонких срезах с помощью окулярной измерительной сетки Автандилова высчитывали удельную площадь открытых и тромбированных сосудов хориоидеи. Для оценки достоверности различий при сравнении средних величин использовали непараметрический критерий Манна – Уитни.

Результаты исследований и их обсуждение

На 1-е сут. после светового воздействия, в эндотелиоцитах хориокапилляров наблюдается отек цитоплазмы, вакуолизация большинства органелл. Вероятно, при повышенной световой нагрузке происходит срыв адаптации и окислительное повреждение эндотелиоцитов. Так, P. Kayatz et al. [9] обнаружили транспорт продуктов перекисидации от фоторецепторов к хориокапиллярам. T. Wu et al [11] после освещения зеленым светом интенсивностью 3500 лк

в течение 3 часов выявили окислительное повреждение ДНК эндотелиоцитов, перитицитов и пигментоцитов (ПЦ).

Дисфункция эндотелия нарушает транспорт метаболитов в пигментоциты и обратный транспорт продуктов обмена. Это приводит к их накоплению в цитоплазме клетки и гибели ПЦ. Цитоплазма таких клеток резко осмиофильна и вакуолизована, ядра пикнотичны. Кроме того, повреждение эндотелия стимулирует тромбообразование. Тромбоциты выделяют воспалительные цитокины, вызывая хемотаксис лейкоцитов, которые в свою очередь индуцируют апоптоз эндотелиоцитов. Свободные радикалы и продукты перекисного окисления липидов увеличивают ригидность мембран эритроцитов и снижают их способность к деформации, что приводит к задержке форменных элементов в микроциркуляторном русле [5]. Все перечисленные процессы вызывают увеличение удельной площади сосудов со стазом, сладжем форменных элементов и тромбозом сосудов до $7,6 \pm 0,5\%$ (контроль $1,52 \pm 0,08\%$; $p < 0,05$) (рис. 1), а также снижение количества открытых сосудов до $20 \pm 2,93\%$ (контроль $36 \pm 0,69\%$; $p < 0,05$) (рис. 2).

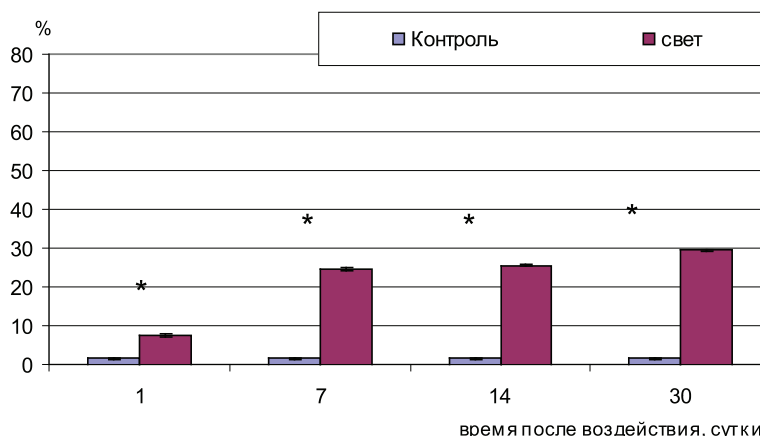


Рис. 1. Удельная площадь сосудов хориоидеи со стазом, сладжем и тромбозом при световом воздействии (6000 лк). Примечание. * – достоверность различий ($p < 0,05$) при сравнении с показателями контрольных животных

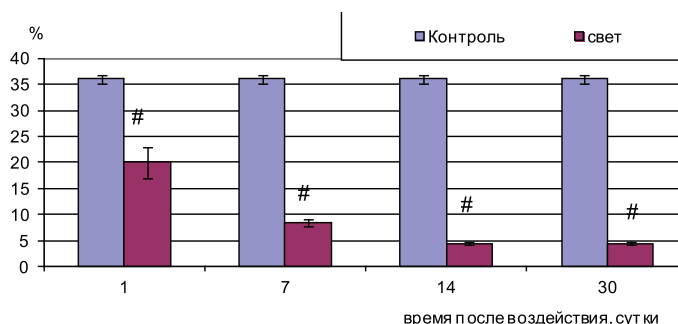


Рис. 2. Удельная площадь открытых неизменных сосудов хориоидеи глаз крыс при световом воздействии (6000 лк). Примечание. # – достоверность различий ($p < 0,05$) при сравнении с показателями контрольных животных

Нарушение перфузии приводит к ишемии наружных слоев сетчатки, не имеющих собственной сосудистой сети. Это, наряду с прямым повреждающим действием света, приводит к очаговому выпадению наружных слоев сетчатки на 7-е сут. после высокоинтенсивного светового воздействия. В очагах поражения наблюдается резкое истончение слоев, образованных нейро-

сенсорными клетками. Встречаются участки, в которых отсутствуют все наружные слои сетчатки, и ассоциативные нейроны внутреннего ядерного слоя оказываются вплотную приближены к мембране Бруха. В области дефектов базального комплекса наблюдаются сосудистые почки, что сопровождается прорастанием новообразованных сосудов хориоидеи в сетчатку (рис. 3).

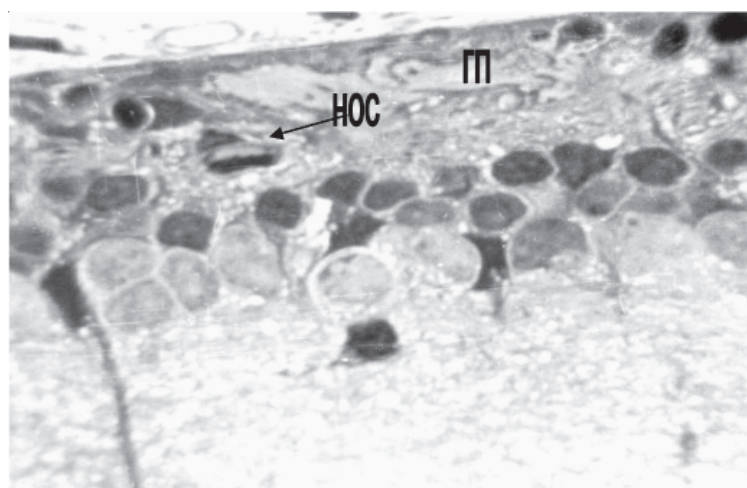


Рис. 3. Структурные изменения сетчатки на 7-е сутки после освещения в очаге поражения. Глиальная пролиферация и новообразованный сосуд в наружном ядерном слое: ПП – глиальная пролиферация; НЭС – новообразованный сосуд. Полутонкий срез. Окраска толуидиновым синим. Ув. 900

В участках, окружающих дефект, наблюдается усиленная пролиферация пигментцитов (ПЦ). Обнаружено, что в ПЦ синтезируются два фактора-антагониста. Фактор роста пигментцитов (PEDF) выделяется через апикальную часть клетки, ингибирует ангиогенез [10], а также обладает нейрпротекторным действием. Фактор роста эндотелиоцитов (VEGF) при нормальных условиях функционирования выделяется в небольших количествах через базальную часть пигментоцита и стимулирует активность хориоидального эндотелия [7].

Очевидно, в патологических условиях нарушается баланс, и VEGF начинает выделяться в больших количествах, кроме того, гипоксия индуцирует экспрессию HIF-1 α фактора, что инициирует неоваскулогенез [12]. По данным D.N. Ausprunk et J. Folkman [6] в новообразованных сосудах практически отсутствует базальная мембрана. Они очень хрупкие и легко кровоточат.

Очаги поражения сетчатки совпадают по размерам и локализации с изменениями сосудов хориоидеи. Просвет большинства сосудов в очагах в экспериментальной группе резко сужен, причем одни из них не имеют форменных элементов, в дру-

гих наблюдаются явления тромбоза, стаза и сладжа, что сопровождается резким снижением удельной площади открытых сосудов (рис. 2) до $8,4 \pm 0,69\%$ (контроль $36 \pm 0,69\%$; $p < 0,05$) и значительным ростом удельной площади сосудов хориоидеи со сладжем форменных элементов и тромбозом (рис. 1) до $24,4 \pm 0,4\%$ (контроль $1,52 \pm 0,08\%$; $p < 0,05$).

На светооптическом уровне сосудистая стенка выглядит утолщенной. При исследовании ультраструктуры хориокапилляров выявляется неравномерное утолщение и разволокнение базальной мембраны эндотелиоцитов, а также дегенеративные изменения части эндотелиоцитов, проявляющиеся деструкцией ядра (пикноз, рексис, лизис) и цитоплазмы (гомогенизация и сморщивание). Обнаруживается неравномерное утолщение базального комплекса вследствие пролиферации волокнистого компонента.

Инtrarетинальные сосуды проявляют относительную резистентность к повреждающим воздействиям. При электронномикроскопическом исследовании сосудов сетчатки со стороны стекловидного тела на первый план выступают изменения перикапиллярных элементов радиальной глии.

Отростки глиоцитов, окружающие капилляр, отечны, обладают низкой электронной плотностью. В цитоплазме этих отростков выявляются вакуоли, большое число лизосом и фагосом. Перикапиллярное пространство расширено. Базальная мембрана капилляров обладает повышенной электронной плотностью, неравномерной толщиной. Цитоплазма эндотелиоцитов бедна органеллами, содержит пиноцитозные везикулы и крупные вакуоли.

Наибольшая сохранность интратинальных сосудов во внутренних слоях сетчатки, вероятно, связана с защитными свойствами радиальной и астроцитарной глии, которые выделяют трофические факторы, уменьшающие деструкцию эндотелия, а также с относительной удаленностью от нейросенсорных клеток – основного источника свободных радикалов и продуктов перекисного окисления липидов.

К 14–30-м суткам после освещения в очагах сетчатки с полным отсутствием пигментцитов и нейросенсорных клеток базальный комплекс утолщен, местами разволокнен, большинство гемокапилляров замещены малодифференцированными клетками фибробластического ряда. В сохранившихся сосудах хориоидеи наблюдается вакуолизация цитоплазмы эндотелиоцитов, снижение количества органелл. Морфометрический анализ показал, что к 30-м суткам после освещения в очагах поражения наблюдается максимальное число тромбированных сосудов – $29,4 \pm 0,34\%$ (контроль $1,52 \pm 0,08\%$; $p < 0,05$) и минимальное число открытых сосудов – $4,4 \pm 0,27\%$ (контроль $36 \pm 0,69\%$; $p < 0,05$).

Заключение

Обнаружено, что наиболее восприимчивы к повреждающему действию света сосуды хориоидеи, чем интратинальные гемокапилляры. Деструкция эндотелия, а также гемодинамические нарушения приводят к очаговому выпадению наружных слоев сетчатки и прорыву гематоретинального барьера, что индуцирует сосудистое новообразование. Неоангиогенез, с одной стороны, является адаптивной реакцией, направленной на восстановление кровоснабжения сетчатки, а с другой стороны – ставит нейроны сетчатки в непривычные условия функционирования и инициирует вторичные дегенеративные изменения.

Список литературы

1. Боголепов, Н.Н. Ультраструктура мозга при гипоксии. – М.: Медицина, 1979. – 168 с.
2. Варакута Е.Ю. Закономерности дегенерации и адаптации сетчатки глаз при экспериментальных ретинопатиях, коррекция биофлавоноидами: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Томск, 2008. – 39 с.

3. Влияние асковертина на морфологические изменения сетчатки крыс при воздействии высокоинтенсивного света / С.В. Логвинов, М.Б. Плотников, Е.Ю. Варакута, А.А. Жданкина, А.В. Потапов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – № 11. – С. 591–594.

4. Островский М.А., Федорович И.Б. Ретиналь как сенсibilизатор фотоповреждения ретинальсодержащих белков сетчатки глаза // Биофизика. – 1994. – Т.39, вып. 1. – С. 13–15.

5. Плотников, М.Б. Лекарственные препараты на основе диквертина / Н.А. Тюкавкина, Т.М. Плотникова. – Томск: из-во Том. ун-та. – 2005. – 228 с.

6. Ausprunk D.H. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis / J. Folkman // Microvasc. Res. – 1977. – Vol. 14, № 1. – P. 53–65.

7. Becerra S.P. Pigment epithelium-derived factor in the monkey retinal pigment epithelium and interphotoreceptor matrix: apical secretion and distribution / R.N. Fariss, Y.Q. Wu et al. // Exp. Eye Res. – 2004. – Vol. 78. – P. 223–234.

8. Boulton M., Rozanowska M., Rozanowski B. Retinal photodamage // J. Photochem. Photobiol. – 2001. – Vol. 64, № 2–3. – P. 144–161.

9. Kayatz P. Ultrastructural localization of light-induced lipid peroxides in the rat retina / K. Heimann, U. Schraermeyer // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 1999. – Vol. 40. – P. 2314–2321.

10. Ogata N. Expression of pigment epithelium-derived factor in normal adult rat eye and experimental choroidal neovascularization / M. Wada, T. Otsuji et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2002. – Vol. 43. – P. 1168–1175.

11. Wu T. Light-induced oxidative stress in choroidal endothelial cells in mice / J.T. Handa, J.D. Gottsch // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2005. – Vol. 46. – P. 1117–1123.

12. Zeng Y. Исследование индуцированной гипоксией экспрессии HIF-1 α в пигментном эпителии сетчатки / G. Li, B. Fan et al. // Бюлл. экспер. биологии и медицины. – 2007. – Т. 143, № 3. – P. 293–297.

References

1. Bogolepov N.N. Meditsina, 1979, p. 168.
2. Varakuta E.Yu. Avtoref. dis. d-ra med. nauk, Tomsk, 2008, p. 39.
3. Logvinov S.V, Plotnikov M.B., Varakuta E.Yu, Zhdankina A.A., Potapov A.V. Byulleten sibirskoy biologii i meditsiny, 2005, no. 11, pp. 591–594.
4. Ostrovskiy M.A, Fedorovich I.B. Biofizika, 1994, T 2, Vol. 1, pp. 13–15.
5. Plotnikov M.B., Tyukavkina N.A., Plotnikova T.M. Tomsk, izdatelstvo Tomskogo yuniversiteta, 2005, pp. 228.
6. Ausprunk D.H., Folkman J. Microvasc. Res, 1977, Vol. 14, no 1, pp. 53–65.
7. Becerra S.P, Fariss R.N., Wu Y.Q. Exp. Eye Res, 2004, Vol.78, pp. 223–234.
8. Boulton M. Rozanowska M., Rozanowski B. Photochem. Photobiol, 2001, Vol. 64, no 2–3, pp. 144–161.
9. Kayatz P., Heimann K., Schraermeyer U. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1999, Vol. 40, pp. 2314–2321.
10. Ogata N., Wada M., Otsuji T. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2002, Vol. 43, pp. 1168–1175.
11. Wu T., Handa J.T., Gottsch J.D. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2005, Vol. 46, pp. 1117–1123.
12. Zeng Y., Li G., Fan B. Byulleten sibirskoy biologii i meditsiny, 2007, T. 143, no.3, pp. 293–297.

Рецензенты:

Солонский А.В., д.м.н., руководитель лаборатории нейробиологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт психического здоровья» СО РАМН, г. Томск;

Мустафина Л.Р., д.м.н., профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск.

Работа поступила в редакцию 24.10.2014.