Характер и динамика фотодегенерации нейросенсорных клеток сетчатки на фоне аллоксанового диабета

Логвинов С.В., Варакута Е.Ю., Потапов А.В.

The Character and Development of photoreceptors photodegeneration combined with alloxan diabetes

Logvinov S.V., Varakuta E.Yu., Potapov A.V.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Логвинов С.В., Варакута Е.Ю., Потапов А.В.

Цель исследования — установить характер и динамику изменений нейросенсорных клеток сетчатки на ранней стадии сахарного диабета при воздействии света высокой интенсивности. Исследование сетчатки проводили на уровне электронной и световой микроскопии.

Эксперименты выполнены на 80 половозрелых беспородных белых крысах-самцах. Крысам 1-й группы ($n = 20$) однократно внутривенно вводили аллоксан в дозе 15 мг/100 г веса с целью моделирования сахарного диабета. Животных 2-й группы ($n = 20$) облучали люминесцентными лампами ЛБ-40 (6000 лк) в течение 6 ч. Крыс 3-й группы ($n = 20$) облучали светом через 1 мес после введения аллоксана. 4-я группа ($n = 20$) — контроль. Декапитацию производили во 2-й и 3-й группах через 1, 7, 14, 30 сут после облучения и в 1-ой группе через 4, 5, 6 и 8 нед после введения аллоксана.

Облучение на фоне диабета вызывает деструкцию пигментоэпителиоцитов, наружных и внутренних отростков нейросенсорных клеток с последующим пикнозом ядер и замещением радиальной глии. На 7-е сут после облучения происходит очаговое выпадение соответствующих слоев сетчатки. В очаге содержание клеток с карипикнозом возрастает в 1,6 раза по сравнению с данными при изолированном световом воздействии.

Таким образом, аллоксановый диабет на ранней стадии своего развития (1 мес) усиливает световое повреждение нейросенсорных клеток сетчатки. Вероятно, большую роль в данном синергистическом эффекте играет увеличение окислительного напряжения и срыв антиоксидантной защиты сетчатки.

Ключевые слова: нейросенсорные клетки, сахарный диабет, свет.

The aim of the research is to determine the character and development of alterations in photoreceptors, caused by high-intensity light on the early stage of diabetes mellitus. The methods of light and electron microscopy were used.

Experiments were obtained from 80 adult white male rats. The rats of group 1 ($n = 20$) received 1 injection of alloxan (15 mg per 100 g of weight) in order to model diabetes mellitus. The rats of group 2 ($n = 20$) were exposed for light of luminescent LB-40 lamps (6000 lx) for 6 hours. The rats of group 3 ($n = 20$) were exposed to the light with the same parameters 1 month after alloxan injection. The last 20 rats made a control group 4. The rats groups 2 and 3 were sacrificed by decapitation 1, 7, 14, 30 days after the light exposure, the rats of group 1 on the 4, 5, 6, 8 week after the alloxan injection.

Light exposure combined with diabetes causes destruction pigment epithelium inner and outer processes of photoreceptors followed by pyknosis of nucleus and replacement by vacuolar glia. On the 7th day after the exposure local disappearance of corresponding retinal layers was observed. In these local sites of the most intensive destruction in group 3 there is 1.6 times more cells with karyopyknosis from in corresponding sites of group 2 (just light exposure) rats.

Thus, alloxan diabetes on the early stage of its development (1 month) intensifies light damage of retinal photoreceptors. Probably, increase of oxidative processes and antioxidative systems breakdown play an important role in this synergistic effect.

Key words: photoreceptor, diabetes mellitus, light.

УДК 617.735:616.631.11:547.854.6

Проблема световых повреждений органа зрения весьма актуальна в связи с внедрением в промышленное производство мощных источников света. Современные офтальмологические при-

боры также нередко вызывают повреждение органа зрения, как у пациентов, так и у медицинского персонала [7, 10, 12]. Поэтому вызывает интерес изучение повреждающего действия света на

глаза с изначальной патологией, такой как диабетическая ретинопатия. Однако сообщения о влиянии излучений оптического диапазона на сетчатку при сахарном диабете единичны [8]. Слабо изучены изменения гематоретинального барьера и наружного ядерного слоя сетчатки при световом воздействии на фоне сахарного диабета.

Цель настоящего исследования — установить характер и динамику изменений нейросенсорных клеток (НК) сетчатки на ранней стадии сахарного диабета при воздействии света высокой интенсивности.

Изучены сетчатки 80 беспородных половозрелых белых крыс-самцов. Крысам 1-й группы ($n = 20$) однократно внутривентрально вводили аллоксан (Sigma) в дозе 15 мг/100 г веса с целью моделирования сахарного диабета. Для контроля наличия у крыс сахарного диабета 1 раз в неделю определяли содержание глюкозы в крови ортотолуидиновым методом. Критерием развития диабета считались значения сахара 20 ммоль/л и выше. Животных 2-й группы ($n = 20$) в течение 6 ч подвергали облучению люминисцентными лампами ЛБ-40, имеющими максимум излучения в фиолетовой и зеленой областях спектра. Для облучения использовалась специальная установка из прямоугольных рефлекторов с вмонтированными в них лампами, освещающая клетку с пяти сторон. Освещенность животных составляла 6000 лк. Крыс 3-й группы ($n = 20$) облучали светом с указанными характеристиками на ранней стадии диабета через 1 мес после введения аллоксана. Все животные содержались в условиях искусственного светового режима: 12 ч — день, 12 ч — ночь, с интенсивностью дневного освещения 25 лк. Декапитацию производили через 1, 7, 14, 30 сут после светового воздействия, в аналогичные сроки производили взятие контрольного материала. В контрольной группе животных ($n = 20$) при динамическом наблюдении статистически достоверных отличий не выявлено, что позволило нам использовать усредненные значения. Животных 1-й группы декапитировали через 4, 5, 6 и 8 нед после введения аллоксана. Центральные участки задней стенки глаза фиксировали в 2,5%-м глютаральдегиде на какодилатном буфере (рН

7,4), постфиксировали в 1%-м растворе четырехоксида осмия и заливали в эпон. Полутонкие срезы окрашивали толуидиновым синим и подсчитывали НК с пикнозом ядра на 1000 клеток с каждой сетчатки, определяли количество слоев и плотность распределения ядер в наружном ядерном слое (НЯС). Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца (Reynolds, 1963) и изучали в электронном микроскопе JEM-7A. Для оценки достоверности различий при сравнении средних величин использовали критерий Манна-Уитни.

В ранние сроки, через 4, 5 нед после введения аллоксана, в 1-й группе изменения пигментного эпителия (ПЭ) и фотосенсорного слоя были незначительны.

В небольшой части пигментоэпителиоцитов увеличивалась базальная складчатость ПЭ, и в цитоплазме повышалось содержание фагосом. Через 6, 8 нед после инъекции аллоксана в цитоплазме ПЭ появлялись многочисленные мелкие вакуоли, ядра гипертрофированы, но некоторые подвержены пикнозу. В части наружных сегментов наблюдались разрыв и дезориентация мембранных дисков. Во внутренних сегментах отмечались отек митохондрий и расширение цистерн эндоплазматической сети. В НЯС возрастало количество

НК с кариопикнозом по сравнению с таковым в контроле (рис. 1). Между ядрами располагались гипертрофированные отечные отростки радиальной глии, что выражалось в снижении численной плотности ядер на 1 мм^2 среза НЯС до 3101 ± 41 против 3491 ± 67 в контроле ($P < 0,05$).

Во 2-й группе животных через 1 сут после воздействия высокоинтенсивного света часть ПЭ сетчатки гипертрофирована, в цитоплазме повышено содержание фагосом, выявляющихся в виде интенсивно окрашенных базофильных гранул различной величины. На ультрамикроскопическом уровне в цитоплазме обнаруживались многочисленные фрагменты наружных сегментов НК. Субретинальное пространство содержало неравномерно утолщенные, фрагментированные наружные сегменты. Ультраструктурные изменения характеризовались дезориентацией мембранных дисков, проявляющейся либо в расширении меж-

мембранных пространств, либо в «склеивании» мембран. Спустя 1 сут в субретинальное пространство выселялись мононуклеары, которые через 7 сут обнаруживались в НЯС и дифференцировались на макрофаги. Возрастало до $7,48 \pm 1,72\%$ (контроль — $2,00 \pm 0,28$; $P < 0,05$) содержание НК с кариопикнозом. Наблюдалось снижение численной плотности ядер в НЯС до 3181 ± 126 на мм^2 среза по сравнению с контролем ($P < 0,05$), что происходило за счет гипертрофии и отека отростков радиальной глии. Че-

рез 7 сут после воздействия света изменения носили очаговый характер. В очаге целостность ПЭ была нарушена, в части клеток исчезала базальная складчатость, цитоплазма резко осмиофильна, в ней появлялись крупные полости, мембранные комплексы, вакуоли с липофусциноподобным содержанием. Базальный комплекс характеризовался утолщением и потерей поперечной исчерченности коллагеновых фибрилл. В субретинальном пространстве отмечалось на-

Рис. 1. Содержание нейросенсорных клеток с кариопикнозом при воздействии высокоинтенсивного света, на фоне аллоксанового диабета и при комбинации данных факторов. 1 — аллоксановый диабет; 2 — высокоинтенсивное световое воздействие; 3 — световое облучение на фоне аллоксанового диабета. Статистически достоверные отличия ($P < 0,05$) отмечены: * — при сравнении с контролем; 0 — свет и диабет+свет

фрагментов разрушенных наружных сегментов. Эллипсоиды внутренних сегментов резко осмиофильны, содержали деструктивно измененные митохондрии и расширенные цистерны эндоплазматической сети. В субретинальное пространство

проникли отростки радиальной глии. Встречались участки с полным отсутствием слоя ПЭ, а также слоя палочек и колбочек. В таких очагах обнаруживались единичные пикноморфные ядра НК, вплотную приближенные к базальному комплексу

(рис. 2). Чаше НЯС истончен до 2—3 слоев (контроль — 12—13 слоев) и уменьшена численная плотность ядер до 1531 ± 202 на мм^2 среза по сравнению с контролем ($P < 0,05$). Достоверно возросло до $49,30 \pm 4,51\%$ содержание НК с кариопикнозом (см. рис. 1). С 14-х по 30-е сут уменьшалось содержание НК с пикнозом ядра по сравнению с данными на 7-е сут, что могло происходить за счет утилизации погибших НК макрофагами, радиальной глией и ПЭ. Сохранившиеся НК характеризовались уменьшением объема цитоплазмы, их ядра деформированы и выглядят, как неправильные многоугольники. Периферические и центральные отростки часто полностью разрушены и утрачены, а перикарионы в виде очень узкой про-

слойки окружали ядро. Описанные клетки опоясывали многослойные глиальные пластины (рис. 3). Численная плотность ядер в НЯС снижалась, достигая минимума на 30-е сут, и составляла 1342 ± 42 на мм^2 среза, что происходило как за счет их деструкции с последующим фагоцитозом, так и вследствие гипертрофии и отека отростков радиальной глии между телами НК.

Вне очагов изменения менее значительны. Часть ПЭ гипертрофирована. Ультрамикроскопически в цитоплазме видны крупные фрагменты наружных сегментов НК, мембранные диски их расслоены, дезориентированы и находятся на различных стадиях лизиса. Базальная складчатость увеличивалась, в цитоплазме определялись

Рис. 2. Структурные изменения сетчатки глаза через 7 сут после светового облучения в очаге. Отсутствие пигментного эпителия и фотосенсорного слоя, наружный ядерный слой вплотную приближен к базальному комплексу и содержит единичные пикноморфные ядра НК (стрелки). Полутонкий срез. Окраска толуидиновым синим. Ув. 900

Рис. 3. Ядро нейросенсорной клетки, окруженное многослойными глиальными пластинами (стрелки), на 14-е сут после высокоинтенсивного светового воздействия. Ув. 17000

многочисленные мелкие вакуоли и микровезикулы, что могло свидетельствовать об усилении транспортных процессов в клетке. Процент НК с карнопикнозом достоверно выше контрольных значений и составляет на 7-е сут $4,58 \pm 0,27\%$. В динамике происходило снижение данного показателя, и на 30-е сут он достигал контрольных значений (см. рис. 1).

В 3-й группе животных изменения ПЭ имели сходный характер с наблюдаемыми переменами во 2-й группе. Отличия появлялись в НЯС очага на 7-е сут после облучения. Содержание клеток с карнопикнозом возрастало до $78,75 \pm 7,24\%$ (см. рис. 1). В динамике (через 14 и 30 сут после облучения) данный показатель снижался, но оставался выше, чем при изолированном световом воздействии. Параллельно снижалась плотность распределения ядер в НЯС и достигала минимального значения на 30-е сут до 1104 ± 62 на мм^2 среза, что в 1,2 раза ниже, чем при изолированном световом воздействии ($P < 0,05$). Это происходило как за счет их деструкции с последующим фагоцитозом радиальной глией и макрофагами, так и вследствие гипертрофии и отека глиальных отростков между перикарионами НК.

Вне очага на 7-е сут процент пикнотичных ядер выше, чем в контроле, в 1,6 раза ($P < 0,05$). В дальнейшем этот показатель снижался и на 30-е сут соответствовал контролю (см. рис. 1). Плот-

ность распределения ядер в НЯС в различные сроки после облучения не отличалась от контрольных значений.

Таким образом, сахарный диабет усиливает фотодегенерацию НК, что особенно ярко проявлялось на 7-е сут после светового воздействия. Вероятно, большую роль в данном синергистическом эффекте играют увеличение окислительного напряжения и срыв антиоксидантной защиты в сетчатке как при световом воздействии [3, 4, 5], так и при сахарном диабете [6, 11]. В основе механизмов светового повреждения лежат реакции фотосенсибилизированного окисления. В сетчатке присутствуют все факторы, необходимые для этого процесса. Это, во-первых, фотосенсибилизатор ретиналя; во-вторых, субстраты окисления — белки и липиды мембранных дисков наружных сегментов НК; в-третьих, кислород. В ткани сетчатки, как известно, парциальное давление кислорода весьма велико, причем около 60% его потребляется именно НК [9].

Сахарный диабет воздействует на сетчатку опосредованно, через развитие ангиоретинопатии с последующим появлением ишемических неперфузированных зон. В наших экспериментах на животных с помощью электронной микроскопии выявлены изменения сосудов сетчатки, которые наблюдаются через 8 нед после введения аллок-

сана. Отмечается сужение просвета интратрети-
нальных сосудов и хориокапилляров за счет на-
бухания ядродержащей части эндотелия. Ци-
топлазма эндотелиоцитов образует складки, вы-
бухания, выступающие в просвет сосудов. Ба-
зальная мембрана выглядит утолщенной, мелко-
зернистой. Часть сосудов полнокровна. Также
происходит утолщение и огрубение мембраны
Бруха. Немаловажная роль в развитии патологи-
ческих процессов сетчатки отводится Мюллеров-
ским глиоцитам, так как они входят в состав ге-
маторетинального барьера. Помимо этого дан-
ные клетки выполняют и трофическую функцию.
Вот почему их повреждение сказывается на кле-
точных элементах сетчатки. Особую роль глиоци-
ты играют в сетчатках бессосудистого типа, в ча-
стности у морских свинок, у которых трофика
нейроретины осуществляется за счет хориока-
пилляров сосудистой оболочки опосредованно
через радиальные глиоциты [2]. По нашим дан-
ным, глиальные реакции при сахарном диабете
характеризуются гипертрофией глиальных отр-
остков, а также дегенерацией перикариона в виде
кариопикноза и вакуолизации цитоплазмы. Эти
изменения усугубляются световым воздействием.
Таким образом, упомянутые сосудистые и гли-
альные реакции усиливают гипоксию, вследствие
которой происходит активация свободно-
радикальных процессов [1].

Литература

1. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М. Роль окисли-
тельного стресса в патогенезе сосудистых ослож-

- нений диабета // Проблемы эндокринологии. 2000.
Т. 46. < 6. С. 29—34.
2. Логвинов С.В., Зуев В.Г., Ушаков И.Б., Тютрин И.И.
Очерки неионизирующей радионейробиологии:
структурно-функциональный анализ. Томск: Изд-во
Том. ун-та, 1994. 208 с.
3. Островский М.А., Богословский А.И., Зуева М.В.
Исследование механизмов повреждающего дейст-
вия видимого света на здоровую сетчатку животных
// Вестник АМН СССР. 1979. < 12. С. 57—61.
4. Островский М.А., Федорович И.Б. Механизмы
повреждающего действия света на фоторецепторы
сетчатки глаза // Физиология человека. 1982. Т. 8.
< 4. С. 572—577.
5. Островский М.А., Федорович И.Б. Ретиналь как
сенситизатор фотоповреждения ретинальсодер-
жащих белков сетчатки глаза // Биофизика. 1994.
Т. 39. Вып. 1. С. 13—15.
6. Baynes J.W., Thorpe S.R. Role of oxidative stress in
diabetic complications: a new perspective on an old
paradigm // Diabetes. 1999. V. 48. < 1. P. 1—9.
7. Dawson W.W. Blue light hazard in rat // Invest.
Ophthalmol. 1976. V. 15. < 8. P. 795.
8. Johnson D.D., O'Steen W.K., Duncan T.E. Photocalli-
induced retinal damage in diabetic rats // Curr. Eye
Res. 1986. V. 5. < 1. P. 1—7.
9. Linssenmeier R.A., Padnick-Silver L. Metabolic
dependence of photoreceptors on the choroid in the
normal and detached retina // Ophthalmol. Vis. Sci.
2000. V. 41. < 10. P. 3117—3123.
10. McDonald H.R., Irvine A.R. Light-induced maculopathy
from the operation microscope in extracapsular cata-
ract extraction and intraocular lens implantation // Oph-
thalmol. 1983. V. 90. P. 945—951.
11. Oberley L.W. Free radicals and diabetes // Free Radic.
Biol. Med. 1988. V. 5. < 2. P. 113—114.
12. Sliney D., Wolbarsht M. Safety with lasers and other
optical sources. A comprehensive handbook // New
York; London: Plenum Press, 1980. P. 1035.

Поступила в редакцию 22.10.2001 г.