

На правах рукописи

Варакута Елена Юрьевна

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ДЕГЕНЕРАЦИИ И АДАПТАЦИИ СЕТЧАТКИ ГЛАЗ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ РЕТИНОПАТИЯХ, КОРРЕКЦИЯ БИОФЛА-
ВОНОИДАМИ

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Томск – 2008

Работа выполнена в ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Росздрава

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор

Логвинов Сергей Валентинович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор Семченко Валерий Васильевич

доктор медицинских наук, профессор Суходоло Ирина Владимировна

доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН Дыгай Александр Михайлович

Ведущая организация ГУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН

Защита диссертации состоится "___" _____ 2008 г. в "___" час на заседании диссертационного совета Д 208.096.03 при ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Росздрава по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

С диссертацией можно ознакомиться в научно - медицинской библиотеке ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Росздрава

Автореферат разослан "___" _____ 2008 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Герасимов А.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

АКТУАЛЬНОСТЬ. Проблема комбинированного действия факторов среды на организм человека является одной из ключевых в биологии, медицине и экологии. Организм всегда находится под прессом действия комплекса факторов и зачастую трудно оценить приоритетность того или иного фактора в возникновении патологии [Ушаков И.Б., 2003]. Однако в настоящее время практически отсутствуют адекватные модели взаимодействия факторов, которые помимо теоретического, имели бы практическое значение для человека, что и послужило поводом для создания модели комбинированного влияния света и экспериментального сахарного диабета на сетчатку глаз.

Поражение органа зрения при сахарном диабете является актуальной проблемой в связи с ростом частоты диабетической ретинопатии, которая в настоящее время стала ведущей причиной необратимой слепоты [Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., 2000; Галстян Г.Р., 2002; Ei-Remessi A.V. et al., 2006]. Морфофункциональные изменения при стойкой гипергликемии касаются практически всех звеньев зрительного анализатора, однако, поражение сетчатки является основной причиной потери зрения [Можеренков В.П., Калинин А.П., 1991; Жабоедов Г.Д. и др., 2000; Нестеров А.П., 2000]. Начальные проявления диабетической ретинопатии возникают уже на ранних стадиях сахарного диабета, что подтверждается электронно-микроскопическими исследованиями базальной мембраны капилляров сетчатки [Anderson H.R. et al., 1995; Ljubimow A.W. et al., 1996; Li Q. et al., 2002]. Экспериментально показано, что изменения касаются в большей степени сосудов микроциркуляторного русла сетчатки и характеризуются нарушениями гемодинамики, а также повреждением сосудистой оболочки глаз [Qaum T., Xu Q., Joussen A.M. et al., 2001; Cheung A.K.H., Fung M.K.L. Lo A.C.Y. et al., 2005; El-Remessy A.V., Al-Shabrawey M., Khalifa Y., 2006]. Также в некоторой степени страдают радиальные глиоциты, ассоциативные и ганглионарные нейроны сетчатки [Bensaoula T., Ottlecz A., 2001; Li Q. et al., 2002; Martin P.M. et al., 2004].

В литературе накоплено большое количество сообщений о повреждающем действии света на сетчатку глаз человека и животных. Как в клинике, так и на производстве нередки ситуации с потенциальной возможностью возникновения и развития фотодегенерации [Michels M. et al., 1990; Arafat A.F. et al., 1994; Bradham M.S. et al., 1995]. Имеются данные о появлении дегенеративных изменений на глазном дне у пациентов, слишком часто подвергавшихся офтальмоскопированию, нарушении сетчатки после глазных операций. [Bradham M.S. et al., 1995; Kohnen S., 2000; Kleinmann G., et al., 2002; Michael R., Wegener A., 2004; Dawson D.G. et al., 2005]. В эксперименте на белых крысах воздействие света высокой интенсивности вызывает деструктивные изменения всех элементов сетчатки глаза. Наблюдаются также гемодинамические расстройства, ультраструктурные нарушения эндотелиоцитов, базальной мембраны капилляров, что приводит к нарушению целостности гематоретинального барьера [Логвинов С.В. и др. 2003; Потапов А.В., 2006].

Общим в патогенезе диабетической ретинопатии и фотодегенерации сетчатки является нарушение микроциркуляции, а также индукция свободнорадикальных окислительных процессов [Островский М.А., 1994; Wolff S.P. et al., 1991; Baynes J.W., 1991; Kashiwagi A., Kikkawa R., 1991].

С точки зрения коррекции возможных нарушений сетчатки при указанных воздействиях вызывают интерес флавоноиды растительного происхождения. Это связано в первую очередь с выраженными антиоксидантными свойствами биофлавоноидов [Петров В.К. и др. 1996; Хазанов В.А. и др. 1999; Кондакова Н.В. и др., 1997; Теселкин Ю.О., 2003]. В Томском НИИ фармакологии СО РАМН предложены препараты: асковертин - смесь диквертина с аскорбиновой кислотой (патент РФ № 2150282, приоритет от 06.11.1998 г.) и каровертин – смесь диквертина, аскорбиновой кислоты и бета-каротина. Диквертин (дигидрохверцетин, таксифолин, 3,3,3,4,5,7-пентагидроксифлавоноид) относится к флавоноидам растительного происхождения [Плотников М.Б. и др., 1999; Плотников М.Б. и др. 2005]. В литературе имеются сведения о выраженных церебропротекторных свойствах асковертина. Он обладает антиоксидантным и атигипоксическим действием, влияет на тонус сосудов, нормализует мозговую гемодинамику, улучшает реологические свойства крови [Плотников М.Б. и др., 2005]. Имеются сведения, что флавоноиды диквертин и танакан повышают активность ферментов антиоксидантной защиты - супероксиддисмутазы и каталазы, тем самым, способствуя замедлению прогрессирования пролиферативной диабетической ретинопатии и улучшению электрофизиологических показателей сетчатки [Балаболкин М.И. и др., 2003]. Известно также, что витамин С способен усиливать антиоксидантные свойства флавоноидов, в частности, диквертина [Middleton E., Kandaswami S., 1992; Бобырева Л.Е., 1998; Плотников М.Б. и др., 2005]. Указанные свойства препаратов дают основание предполагать о возможности их использования для патогенетической коррекции фотоповреждения сетчатки на фоне аллоксанового диабета. Вместе с тем в доступной литературе отсутствуют сведения о модифицирующем влиянии данных биофлавоноидов на структурные изменения сетчатки глаза при экспериментальных ретинопатиях.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Изучить закономерности дегенерации и адаптации клеточно-тканевых элементов сетчатки глаз при экспериментальных ретинопатиях, индуцированных воздействием света различной интенсивности и продолжительности, а также в комбинации с аллоксановым диабетом. Установить характер влияния асковертина и каровертина на морфофункциональное состояние компонентов сетчатки белых крыс при указанных воздействиях, и сравнить возможные ретинопротекторные свойства данных препаратов.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ.

1. Создать модели ретинопатий посредством светового воздействия различной интенсивности и продолжительности, а также освещения в комбинации с аллоксановым диабетом на сетчатку глаз. Изучить вклад каждого фактора и их взаимодействие с целью выявления общих закономерностей повреждения и репарации тканевых компонентов сетчатки глаз.

2. Установить характер и динамику изменений нейрональной популяции и глиальных элементов сетчатки, а также глионейрональные взаимоотношения при фотоповреждении на фоне гипергликемии с использованием методов математического моделирования.
3. Изучить в динамике ультраструктурные изменения синаптоархитектоники сетчатки при воздействии указанных факторов.
4. Исследовать сосудистые реакции сетчатки и ультраструктуру гематоретинального барьера при фотоповреждении на фоне гипергликемии.
5. Определить последовательность и взаимосвязь клеточных реакций для выяснения их роли в тканевых механизмах дегенерации и адаптации при воздействии высоко- и низкоинтенсивного света на фоне гипергликемии.
6. Выявить модифицирующее влияние биофлавоноидов: асковертина и каровертина на сетчатку при воздействии указанных факторов и сравнить возможные ретинопротекторные эффекты препаратов.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА. С помощью гистологических, электронномикроскопических и морфометрических методов впервые обнаружено, что при световом воздействии и освещении на фоне гипергликемии выраженность деструкции сетчатки в большей степени зависит от интенсивности освещения, а не от его продолжительности. При высокоинтенсивном световом воздействии и освещении на фоне гипергликемии в динамике на 7-е сут появляются очаговые изменения сетчатки. Выявлено, что наиболее поражаемыми структурами при указанных воздействиях являются нейросенсорные клетки (НСК) и пигментный эпителий (ПЭ). Изменения нейрональной популяции сетчатки при высокоинтенсивном световом воздействии и освещении на фоне гипергликемии характеризуются деструкцией закономерно убывающей в следующей последовательности: нейросенсорные клетки - ассоциативные нейроны - ганглионарные нейроны. Относительная сохранность ганглионарных нейронов, возможно, связана с высокой активностью в них белка bcl-2, в несколько раз превышающая активность гена p-53, что было выявлено при иммуногистохимическом исследовании сетчаток. В популяции ассоциативных нейронов наиболее подвержены деструкции амакринные нейроны, минимальной чувствительностью к повреждающим факторам обладают горизонтальные нейроны. По результатам исследования удельной площади органелл в биполярных и ганглионарных нейронах показана наибольшая чувствительность гранулярной эндоплазматической сети (ЭПС) и митохондрий, что лежит в основе хроматолитических изменений различной выраженности. Межнейрональные связи также высокочувствительны к световому воздействию. Обнаружено, что наибольшей деструкции подвержены синапсы наружного сетчатого слоя, а в очагах деструкции нейросенсорных клеток (при освещении 6000 лк) этот слой полностью отсутствует, и тела ассоциативных нейронов смещаются к наружной глиальной пограничной мембране. Во внутреннем сетчатом слое отмечается снижение общей численной плотности синапсов преимущественно за счет асимметричных контактов. Изменения синаптического пула сетчатки после длительного низкоинтенсивного светового воздействия на фоне гипергликемии и без нее имеет адаптивный характер, вы-

ражающийся сохранением общей численной плотности синапсов после 7 сут. светового воздействия. Однако имеет место и деструктивный эффект, характеризующийся снижением количества активно функционирующих искривленных контактов, и сохранность более статичных плоских синапсов. После освещения в течение 30 сут. наблюдается срыв адаптации, характеризующийся снижением численной плотности синапсов по сравнению с данными после 7 сут. светового воздействия. В механизмах репарации синаптического пула сетчатки после указанных воздействий ведущую роль играют процессы неосинаптогенеза и созревание контактов ювенильного типа. Реакция глиальных элементов сетчатки на воздействие повреждающих факторов неоднозначна и характеризуется как регрессивными, так и прогрессивно-пролиферативными изменениями. Установлена роль радиальных глиоцитов в изоляции деструктивных элементов от неизменной ткани посредством образования многослойных глиальных пластин. Пустоты, появившиеся вследствие гибели нейронов, также заполнены пролиферирующими глиальными отростками. Выраженность изменений компонентов гематоретинального барьера неодинакова и убывает в ряду: пигментоэпителиоциты - хориокапилляры - базальный комплекс.

Установлено, что курсовое введение биофлавоноидов асковертина и каровертина приводит к уменьшению очагов поражения, что связано с ростом удельной площади открытых сосудов, увеличением функциональной активности пигментного эпителия, большей сохранностью нейросенсорных клеток в обеих экспериментальных группах благодаря выраженным антиоксидантным и гемореологическим свойствам перпаратов. Выявлено, что данные антиоксиданты улучшают глионейральные и межнейрональные взаимодействия, способствуя снижению деструкции и увеличению регенераторного потенциала радиальной глии, повышая устойчивость нейронов внутренних слоев сетчатки и их синаптические контакты к повреждению. Показано, что наибольший ретинопротекторный эффект отмечен при однократном высокоинтенсивном воздействии, нежели при длительном непрерывном низкоинтенсивном освещении.

Впервые разработана математическая модель, позволяющая оценить изменения клеточных элементов сетчатки при воздействии высоко- и низкоинтенсивного света в комбинации с аллоксановым диабетом в любой момент времени на протяжении эксперимента, а также прогнозировать эти изменения по временному критерию.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ. Получены новые знания о закономерностях морфофункциональных изменений структурных компонентов сетчатки при световом воздействии, освещении на фоне аллоксанового диабета и коррекции биофлавоноидами асковертин и каровертин. Данные об усилении альтерации при воздействии света на фоне диабета могут быть использованы для разработки гигиенических стандартов при проведении офтальмологического обследования больных с диабетической ретинопатией. Представленные в диссертации данные о протективном эффекте препаратов на сетчатку глаза при воздействии света на фоне аллоксанового диабета могут быть использова-

ны для разработки новых подходов профилактики и патогенетического лечения одного из осложнений сахарного диабета - ретинопатии.

Материалы работы используются в учебном процессе при чтении лекций на кафедре гистологии, эмбриологии и цитологии Сибирского государственного медицинского университета по разделу "Органы чувств".

Работа выполнена в соответствии с планом проблемной комиссии Межведомственного научного совета при Президиуме РАМН "Структурно-функциональные основы организации мозга в норме и патологии".

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ.

1. Наиболее выраженную дегенерацию сетчатки вызывает кратковременное высокоинтенсивное световое воздействие на фоне экспериментального сахарного диабета. Данный эффект характеризуется очаговой гибелью НСК и ПЭ. В поздние сроки отмечаются процессы адаптации, характеризующиеся репарацией наружных отростков сохранившихся НСК и фагоцитозом деструктивно измененных фоторецепторов. Препараты асковертин и каровертин увеличивают сохранность НСК, приводя к снижению площади очагов поражения.
2. Нейроны внутренних слоев сетчатки менее чувствительны к указанным воздействиям по сравнению с НСК. При высокоинтенсивном освещении наиболее поражаемы амакринные нейроны, а наименее - горизонтальные. При длительном низкоинтенсивном световом воздействии изменения ассоциативных нейронов имеют обратимый характер и проявляются только на ультраструктурном уровне. Введение препаратов защищает мембранные структуры нейронов и улучшает межнейрональные взаимодействия.
3. Деструкция радиальной глии вносит значительный вклад в дегенерацию нейронной популяции сетчатки, а ее пролиферативная активность приводит к изоляции очагов деструкции от неизмененных тканей, что является отражением адаптации. Введение препаратов снижает деструкцию радиальной глии, препятствуя развитию вторичных альтеративных изменений.
4. Повреждение сосудов сетчатки и хориоидеи при воздействии указанных факторов, наряду с очаговой деструкцией ПЭ приводит к прорыву гемато-ретиального барьера, а при освещении (6000 лк) развитию неоангиогенеза. Введение препаратов предупреждает деструкцию компонентов сосудистой стенки, улучшает состояние гемореологии и вносит вклад в уменьшение площади очагов поражения.

АПРОБАЦИЯ. Материалы диссертации доложены на VII Международном конгрессе ассоциации морфологов (Казань, 2004); на научном совещании гистологов на тему "Актуальные проблемы учения о тканях" (Санкт-Петербург, 2006); V съезде по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность) (Москва, 2006); VIII Международном конгрессе ассоциации морфологов (Орел, 2006); на конференции посвященной 100-летию со дня рождения проф. И.С. Кудрина (Тверь, 2006); на Всероссийской конференции с международным участием "Структурно-функциональные и ней-

рохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга (Москва, 2006; 2007); VII международной научно-практической конференции "Здоровье и образование в XXI веке" (Москва, 2007).

ПУБЛИКАЦИИ. По теме диссертации опубликована 30 работ, из них 11 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ для опубликования основных результатов диссертации на соискание ученой степени доктора наук.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, результатов собственных исследований, обсуждения и выводов. Работа изложена на 385 страницах, иллюстрирована 8 таблицами, 175 рисунками. Библиографический указатель включает 604 источников из них 177 на русском и 427 на иностранном языках.

СОБСТВЕННЫЕ НАБЛЮДЕНИЯ МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 310-ти беспородных белых крысах самцах с первоначальной массой 150-180 г, полученных из вивария СибГМУ.

До начала эксперимента крыс выдерживали на протяжении двухнедельного карантинного срока в условиях вивария с учетом традиционных требований к содержанию экспериментальных животных на обычном пищевом рационе. Для исключения влияния сезонных колебаний эксперимент проводился в осенне-зимний период. Начало экспериментальных воздействий, и взятие материала осуществляли в одно и тоже время суток – в 10-12 часов с учетом известных вариаций зрительных структур. Животных содержали в стандартных условиях вивария при световом режиме 12 часов день, 12 часов ночь с искусственным дневным освещением низкой интенсивности 20 лк.

При проведении экспериментов животных помещали в специально сконструированную установку из прямоугольных рефлекторов с вмонтированными в них лампами, освещающих клетку с 5-и сторон. В ней производилось тотальное кратковременное высокоинтенсивное (6000 лк) и длительное низкоинтенсивное (200 лк) освещение люминесцентными лампами ЛБ-40 с максимумом излучения в желто-зеленой области спектра. Перед освещением проводили атропинизацию и дикаинизацию глаз животных. Дозиметрический контроль освещенности осуществляли с помощью люксметра.

Сахарный диабет моделировали путем однократного внутрибрюшинного введения аллоксана в дозе 15 мг/100 г. Критерием тяжести заболевания служили уровень гипергликемии, потеря массы тела, выраженность полиурии. Содержание сахара в крови определяли глюкозооксидазным методом с помощью набора "Новоглюк" (г. Новосибирск) 1 раз в неделю. Средний уровень сахара на 7-е сут после введения аллоксана составил – 20,1 ммоль/л (контроль 5-7 ммоль/л).

В качестве предполагаемых ретинопротекторов использовали препараты "Асковертин" - (патент РФ № 2150282, приоритет от 06.11.1998г.) и «Каровертин» - (регистрационное удостоверение МЗ РФ № 003406.Р.643.10.2001), разра-

ботанные в НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН коллективом авторов: М.Б. Плотников, О.И. Алиев, М.Ю. Маслов и др. Асковертин вводили в дозе 70 мг/кг (20 мг/кг - диквертина, 50 мг/кг аскорбиновой кислоты, а каровертин - из расчета 10 мг/кг дигидрохверцетина, 50 мг/кг аскорбиновой кислоты и 1 мг/кг β -каротина в 1% крахмальной слизи. При высокоинтенсивном световом воздействии препараты вводили в течение 5-ти дней ежедневно внутрижелудочно 1 раз в сутки, первое введение препарата осуществляли за двое суток до освещения. При длительном низкоинтенсивном световом воздействии - ежедневно на протяжении всего периода освещения.

Животных выводили из эксперимента посредством декапитации под эфирным наркозом. В максимально короткий срок после умерщвления осуществляли энуклеацию глаз. В контрольную группу входили 50 интактных крыс, которых содержали в идентичных условиях вивария с экспериментальными животными. График опытов планировался таким образом, что забой экспериментальных животных производился одновременно с контрольной группой крыс.

Серии экспериментов 1, 3, 4 и 5 выполнены совместно с к.м.н. А.А. Жданкиной. Эксперименты проводили с соблюдением приказа Министерства здравоохранения СССР за № 755 от 12.08.77 об обеспечении принципов гуманного обращения с животными и федеральным законом РФ "О защите животных от жестокого обращения" от 01.01.1997.

Микроскопическое исследование

Глазные яблоки фиксировали в жидкости Карнуа и заливали в парафин. Отвесные срезы задней стенки глаза окрашивали гематоксилином и эозином [Ромейс Б., 1954], крезоловым фиолетовым по Nissl [Лили Р., 1969] - для выявления хроматофильного вещества в перикарионах нейронов.

Иммуногистохимические исследования

С целью проведения иммуногистохимического исследования материал фиксировали в 12% нейтральном формалине в течение 24 часов [Эллиниди В.Н. и др., 2002]. Далее объекты заливали в парафин по обычной схеме. На парафиновых срезах проводили двухэтапные реакции для выявления белков-маркеров апоптоза – p 53 и bcl-2. На первом этапе депарафинированные срезы подвергали предварительной высокотемпературной обработке с целью демаскировки антигена, а затем инкубации с первыми (специфичными) антителами в течение ночи при температуре +4° С. На втором этапе проводили инкубацию со вторыми антителами, авидин-биотин-пероксидазным комплексом с последующим выявлением пероксидазы хрена диаминобензидином.

Готовые срезы докрасивали квасцовым гематоксилином и заключали в канадский бальзам. Результаты иммуногистохимической реакции оценивали по 4-бальной шкале на 100 клеток с каждой сетчатки при увеличении 10x40. Интенсивность окраски определяли следующим образом [Эллиниди, В.Н., 2002]: 0 - нет окрашивания, 1 - слабое окрашивание, 2 - умеренное окрашивание, 3 - сильное, 4 - очень сильное окрашивание. p-53 и bcl 2 – положительными нейронами считали клетки, получившие 3 и 4 балла по шкале интенсивности.

Таблица 1. Распределение животных по сериям эксперимента.

№	Серия эксперимента	Кол-во животных	Сроки взятия материала (сут)
1	Воздействие света (6000 лк, 6 ч.)	20	1, 7, 14, 30
2	Аллоксановый диабет (1месяц)	20	Через 4, 5, 6 и 8 недель после введения аллоксана
3	Световое воздействие (6000 лк, 6 ч.) через месяц после введения аллоксана	20	1, 7, 14, 30
4	Световое воздействие (6000 лк, 6 ч.), коррекция асковертином	20	1, 7, 14, 30
5	Световое воздействие (6000 лк, 6 ч.) через месяц после введения аллоксана, коррекция асковертином	20	1, 7, 14, 30
6	Световое воздействие (6000 лк, 6 ч.), коррекция каровертином	20	1, 7, 14, 30
7	Световое воздействие (6000 лк, 6 ч.) через месяц после введения аллоксана, коррекция каровертином	20	1, 7, 14, 30
8	Освещение животных (200 лк) в течение 1, 7, 14, 30 сут	20	После окончания освещения
9	Световое воздействие (200 лк) в течение 1, 7, 14, 30 суток через месяц после введения аллоксана	20	После окончания освещения
10	Освещение животных светом 200 лк в течение 1, 7, 14, 30 сут. на фоне введения асковертина.	20	После окончания освещения
11	Световое воздействие (200 лк) в течение 1, 7, 14, 30 суток через месяц после введения аллоксана, коррекция асковертином	20	После окончания освещения
12	Освещение животных светом 200 лк в течение 1, 7, 14, 30 сут на фоне введения каровертина.	20	После окончания освещения
13	Световое воздействие (200 лк) в течение 1, 7, 14, 30 суток через месяц после введения аллоксана, коррекция каровертином	20	После окончания освещения

Электронно-микроскопическое исследование

Для изучения ультраструктурных изменений заднюю стенку глаз фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида, забуференного на 0,2 М какодилатном буфере (рН 7,4). Материал постфиксировали в 2% растворе четырехокси осмия на холоде в течение 3-х часов, дегидратировали в спиртах восходящей концентрации и заливали в эпон.

На осмированных препаратах плохо выявляются филаментозные парамембранные образования, поэтому для количественного изучения синаптического пула на этапе дегидратации, без предварительного осмирования, сетчатки контрастировали в 5% растворе фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК) на абсолютном спирте в течение 3-х часов.

На ультратоме LKB-4 (Швеция) готовили полутонкие и ультратонкие срезы. Просмотр и фотографирование полутонких срезов производили на световом микроскопе "Люмам И1". Ультратонкие срезы помещали на медные сетки. Осмированные препараты докрашивали уранилацетатом и цитратом свинца (Reynolds, 1963) и изучали в электронном микроскопе JEM - 7A.

Морфометрический анализ

На парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином определяли удельную площадь очагов поражения сетчатки с использованием окулярной сетки Автандилова с 5-ти срезов каждой сетчатки при увеличении 10x40. На срезах, окрашенных крезиловым фиолетовым, подсчитывали процент ганглионарных нейронов с очаговым и тотальным хроматолизом на 200 клеток с каждой сетчатки. На полутонких, окрашенных толуидиновым синим срезах, производили подсчет НСК клеток с деструкцией ядра (пикноз, рексис, лизис) на 1000 клеток с каждой сетчатки. Определяли количество слоев и плотность распределения ядер в наружном ядерном слое (НЯС). Подсчет клеток производили в окулярной рамке на площади 146 мкм² с 5 срезов каждой сетчатки при увеличении 10x90. Высчитывали удельную площадь среза слоев сетчатки, а также открытых неизмененных и сосудов хориоидеи с явлениями сладжа и тромбоза. Определяли глио-нейрональный индекс - отношение числа радиальных глиоцитов к ассоциативным нейронам ВЯС на 50 полях зрения с каждой сетчатки при увеличении 10x90. Высчитывали процент пикноморфных радиальных глиоцитов, нейронов внутреннего ядерного и ганглионарного слоев на 200 клеток с каждой сетчатки. На электронных микрофотографиях внутреннего ядерного и ганглионарного слоев определяли удельную плотность органелл ассоциативных и ганглионарных нейронов с помощью открытой квадратной тестовой решетки с шагом 5 мкм при увеличении 10000.

Для оценки изменений синаптоархитектоники фотографировали по 15 случайно выбранных полей зрения внутреннего сетчатого слоя с 5 срезов каждой сетчатки при стандартном увеличении 8500. При конечном увеличении 30000 на сканированных электронно-микроскопических фотографиях определяли количество межнейронных контактов (площадь поля зрения – 50 мкм²) и высчитывали численную плотность синапсов на 100 мкм² нейропиля. Выявленные ФВК-позитивные контакты в зависимости от плоскости среза подразделяли

на ряд категорий. Анализировали только те контакты, в которых четко были видны все элементы ССЕ: электронноплотный материал пресинаптической зоны, синаптической щели и постсинаптической части. В плоскость среза контактов неопределенного вида попадала только часть ССЕ. Подсчитывали количество определенных контактов с асимметричной и симметричной организацией ССЕ. Для асимметричных контактов характерно дискретное расположение ФВК-позитивного материала пресинаптической зоны в виде плотных проекций (ПП) пресинаптической решетки, а в симметричных контактах электронноплотный материал персинаптической зоны неорганизован в отдельные филаментозные образования. Асимметричные контакты, в свою очередь, по степени выраженности ПП дифференцировали на типы: А, В, С [Семченко В.В., Степанов С.С., 1987]. В контактах типа А высота ПП пресинаптической решетки была больше 60 нм, в контактах типа В соответствовала 50-60 нм, а контактах типа С – меньше 50 нм. Длину активной зоны контакта (АЗК), которая на ФВК-контрастированном материале соответствовала всему синаптическому профилю, определяли с помощью тестовой решетки с шагом 3 мкм. По протяженности АЗК все контакты делили на очень мелкие (<100 нм), мелкие (100-200 нм), малые (200-300 нм), средние (300-500 нм), крупные (500-700 нм) и очень крупные (>700 нм). Подсчитывали численную плотность плоских, "+" и "-" изогнутых синапсов [Семченко В.В., Степанов С.С., 1995].

Цифровой материал обработан общепринятыми методами вариационной статистики [Автандилов Г.Г. и др., 1990]. Для каждой выборки вычисляли выборочное среднее и стандартную ошибку выборочного среднего. С помощью критерия Колмогорова обнаружено отсутствие согласия данных с нормальным распределением, в связи с чем, для оценки различий между независимыми выборками применяли критерий Манна-Уитни. Различия считались достоверными при $p < 0,05$. Полученные данные обрабатывали также методом корреляционного анализа. Статистическая обработка результатов была проведена с использованием пакета STATISTICA 6.0. По данным экспериментов проводилось построение математической модели изменений при помощи методов, реализованных в программной среде mathCAD (интерполяция, регрессия, аппроксимация).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что световое воздействие вызывает закономерные, зависящие от интенсивности, продолжительности воздействия и времени после освещения изменения всех компонентов сетчатки. Аллоксановый диабет усиливает деструктивные эффекты света, что в первую очередь связано с патологией сосудов микроциркуляторного русла. Наибольшим изменениям после светового воздействия, а также освещения на фоне аллоксанового диабета подвержены пигментный эпителий, нейросенсорные клетки, синапсы и радиальная глия.

В первую очередь как при высоко-, так и при низкоинтенсивном воздействии изменения возникают в наружных сегментах НСК, так как они являются первичными акцепторами световых квантов, характеризующиеся крайне высо-

ким содержанием полиненасыщенных жирных кислот и белков. Данные изменения характеризуется расслоением, фрагментацией, вакуольной дегенерацией мембран, что отмечают многие исследователи [Логвинов С.В. и др., 2005; Johnson D.D. et al., 1986; Mirshahi M. et al., 1991; Rosner M. et al., 1992; Chen E., 1993; Unoki K. et al., 1994; Koutz R. et al., 1995; Organisciak D.T., et al., 2003]. Высокоинтенсивное световое воздействие вызывает очаговый характер изменений сетчатки с практически полным исчезновением в очагах фотосенсорного и наружного ядерного слоев. После светового воздействия относительная площадь очагов в срезах составляет 27% от всей сетчатки, освещение на фоне аллоксанового диабета приводит к увеличению площади поражения в 2 раза. Такой мозаичный характер повреждения при изучаемых воздействиях, возможно связан, с изначально различной функциональной активностью сосудов микроциркуляторного русла и пигментного эпителия сетчатки.

На 7-е сут после освещения (6000 лк) в очагах поражения происходит снижение удельной площади фотосенсорного слоя по отношению к контролю в 4 раза и в 5,3 раза в группе после освещения на фоне аллоксанового диабета. К 30-м сут в обеих группах в участках, соответствующих очагам, фотосенсорный слой практически отсутствует. В обычных условиях в наружных сегментах НСК совершаются первичные процессы зрительной рецепции – возбуждение и адаптация, в экстремальных ситуациях, будь то слишком яркое или длительное освещение, в них разыгрываются процессы окисления. При этом обесцвеченный ретиналь, поглощая свет в присутствии кислорода и субстратов окисления – белков и липидов, выступает в качестве фотосенсибилизатора процессов свободнорадикального окисления в сетчатке и играет ведущую роль в развитии повреждения мембран наружных сегментов НСК [Островский М.А. и др., 1991; Островский М.А., Федорович И.Б., 1982, 1994; Masuda K. et al., 1995; Sakmar T.P., 2002]. Кроме того, установлено, что различные изомеры ретиналя являются эффективными фотогенераторами синглетного кислорода. В результате его химического тушения ретиналем и фосфоинозидами мембран НСК образуются их гидроперикисные производные, способные индуцировать реакции свободнорадикального окисления липидов [Кулиев И.Я., Шведова А.А., 1982]. Внутренние сегменты на начальных этапах после обоих видов воздействий увеличиваются в размерах, в них происходит деструкция гранулярной ЭПС, что приводит к нарушению синтеза структурных белков, а также транспортных процессов и как следствие - замедление регенерации наружных сегментов. Также развивается деструкция митохондрий. Сначала наблюдается набухание митохондрий, что является компенсаторно-приспособительной реакцией. В последующем отмечена деструкция крист митохондрий, а некоторые из них имеют вид полых мешочков, что с одной стороны приводит к нарушению процессов энергообразования, а с другой стороны активизирует каспазный механизм апоптоза [Zamzami N. et al., 1996].

На 14-30-е сут после освещения в очагах поражения внутренние сегменты резко осмиофильны, подвергаются фрагментации и теряют связь с перикарионом. В некоторых участках фотосенсорный слой полностью отсутствует.

Курсовое введение асковертина и каровертина приводит к достоверному снижению площади очагов поражения при световом воздействии в 1,5 раз, при освещении на фоне аллоксанового диабета в 1,6 раза.

Ультраструктурные изменения наружных и внутренних сегментов НСК после освещения в группах животных, получавших препараты, были аналогичны описанным выше, однако проведение количественного анализа позволяет нам сделать вывод об их защитном эффекте.

На первые сутки как после светового воздействия, так и после освещения на фоне аллоксанового диабета удельная площадь фотосенсорного слоя значительно не отличалась от контрольных значений. На 7-е, 14-е и 30-е сут в очагах поражения наблюдалось достоверное снижение данного показателя, однако он оставался выше значений групп без использования препаратов. Наблюдаемые эффекты препаратов асковертин и каровертин в отношении наружных отростков НСК, вероятно, связаны как с их антиоксидантной активностью, так и с проявлением иных свойств, способствующих снижению патологических процессов. Во-первых, как было показано выше, высокоинтенсивное световое воздействие запускает процессы фотооксидации в дисках фоторецепторов, в результате чего активируется выработка свободных радикалов. Ведущая составляющая препаратов – диквертин является ловушкой радикалов, цепьпрерывающим агентом [Тюкавкина Н.А. и др., 1995; Теселкин Ю.О. и др., 1996, 1999; Теселкин Ю.О., 2003; Плотников М.Б. и др., 2005]. Во-вторых, наружные сегменты состоят из мембранных дисков, основным компонентом которых являются липиды, относящиеся к легкоокисляющимся субстратам. Диквертин имеет способность оказывать “мембраностабилизирующее” действие, улучшая липидный обмен и замедляя образование липидных гидропероксидов. Аскорбиновая кислота, входящая в состав препаратов, повышает фармакологическую активность диквертина и сама выступает в роли антиоксиданта, при этом между ними отмечается мощный эффект синергизма [Middleton E., Kandaswami S., 1992; Плотников М.Б. и др., 2005]. В-третьих, степень восстановления наружных сегментов напрямую зависит от состояния внутренних сегментов [Baker V.N. et al., 1986; Moria M. et al., 1986]. Доказано, что применение асковертина в условиях ишемии мозга приводит к снижению деструкции митохондрий и эндоплазматической сети [Плотников М.Б. и др., 2000; Пугаченко Н.В. и др., 2000; Логвинов С.В. и др., 2001]. В связи с чем, можно предположить, что использование препаратов при световом воздействии ведет к снижению деструкции митохондрий и гранулярной эндоплазматической сети внутренних сегментов НСК, улучшая ферментативную активность митохондрий и белоксинтезирующую функцию клетки. В состав каровертина входит также антиоксидант β -каротин в дозе 1 мг/кг. Однако ретинопротекторное действие каровертина существенно не отличается от эффектов, вызванных асковертином. Возможно, это связано с меньшим, чем в асковертине, содержанием дигидрокверцетина.

Более выраженный деструктивный эффект светового воздействия при аллоксановом диабете в отношении НСК объясняется не только прямым повреждающим действием яркого света, но и опосредованным механизмом, связан-

ным с сосудистыми изменениями. Уже на начальной стадии сахарного диабета наблюдаются патологические изменения хориокапилляров, выражающиеся сужением просвета за счет набухания ядросодержащей части эндотелиоцитов, утолщением базальной мембраны, деструкцией перицитов [Сорокин Е.Л., Смолякова Г.П., 1997; Kern T.S., Engerman R.L., 1995; Yang Y. et al., 1997; Imesch P.D. et al., 1997; Dagher Z. et al., 2004; Hughes S., et al., 2007]. Нарушаются также вязкостные характеристики крови, увеличивается агрегация эритроцитов, снижается их деформируемость, наблюдается гиперфибриногенемия, в связи с чем, происходит ухудшение транспорта кислорода и развивается микроангиопатия [Галенок В.А. и др., 1987; Евграфов В.Ю. и др., 2004; Le Devehat C. et al., 1994; Antonetti D.A. et al., 2006]. Следует отметить, что в начальный период развития диабета НСК менее подвержены изменениям, чем нейроны внутренних слоев сетчатки, вероятно вследствие того, что их наружные сегменты погружены в пигментный эпителий, обладающий мощной антирадикальной защитой. Таким образом, фотосенсорный слой остается относительно интактным [Гаджиев В.Г., 1998]. Однако деструктивные изменения пигментоэпителиоцитов и нарушение их взаимосвязей с НСК при высокоинтенсивном световом воздействии способствуют снижению защитных свойств фоторецепторов, т.к. известно, что сохранность структуры и функции пигментного эпителия является одним из условий нормального функционирования сетчатки [Думброва Н.Е., 1991].

Ядросодержащие части НСК подвергаются деструкции в виде кариопикноза, рексиса и лизиса. Анализ данного показателя свидетельствует о следующих закономерностях: во-первых, тяжесть поражения в большей степени зависит от интенсивности воздействия, нежели от его продолжительности. Об этом мы можем судить по показателю деструкции ядер через сутки после светового воздействия. Обнаружено, что содержание деструктивно измененных ядер НСК выше после кратковременного высокоинтенсивного светового воздействия по сравнению с таковым при низкоинтенсивном световом воздействии продолжительностью 1, 7, 14 и 30 сут.

Во-вторых, НСК наиболее восприимчивы, как к световому воздействию, так и к освещению на фоне аллоксанового диабета, однако обладают высокой способностью к адаптации, о чем свидетельствует относительная сохранность наружных отростков при низкоинтенсивном световом воздействии, возрастающей продолжительности. Основная масса НСК восстанавливает свое строение даже при тотальной деструкции наружных отростков, что является отражением репаративных возможностей НСК.

В-третьих, действие препаратов антиоксидантов наиболее эффективно при кратковременном высокоинтенсивном световом воздействии, нежели при длительном низкоинтенсивном.

Световое воздействие (6000 лк) вызывает деструкцию ядер НСК уже через сутки после освещения. На 7-е сут появляются очаги повреждения, где содержание деструктивных ядер НСК максимально и достигает $49,01 \pm 0,47\%$ - при световом воздействии и $77,92 \pm 1,31\%$ - при освещении на фоне гипергликемии (контроль $0,4 \pm 0,008\%$, $p < 0,05$). На 21-25 сут по данным математического моде-

лирования процент дегенеративно измененных ядер НСК снижается, оставаясь выше контрольных значений, что связано с фагоцитозом погибших клеток ПЭ, радиальными глиоцитами, макрофагами, мигрирующими из микроциркуляторного русла в сетчатку. В последующие сроки отмечена динамика роста данного показателя с максимумом на 35-е сут.

Необходимо отметить, что после освещения на фоне аллоксанового диабета изменения НСК более выражены по сравнению с таковыми после светового воздействия. Кроме того, математическое моделирование показало более медленное снижение содержания деструктивных ядер НСК с минимумом на 24-26 сут, по сравнению с таковым при изолированном освещении. Данный эффект, вероятно, связан с усилением сосудистых нарушений, а также окислительных процессов, что играет существенную роль в патогенезе диабетической ретинопатии [Engerman R., Kern T., 1995; Fagrell B. et al., 1999].

После курсового введения препаратов сохранность НСК значительно повышается. Так на 7-е сут количество деструктивных ядер после светового воздействия при введении асковертина составляет $4,98 \pm 0,09\%$ и $6,37 \pm 0,49\%$ - при введении каровертина, при освещении на фоне аллоксанового диабета с коррекцией асковертином - $7,93 \pm 0,39\%$ и $8,8 \pm 0,39\%$ - при использовании каровертина, оставаясь достоверно выше контроля ($p < 0,05$).

При низкоинтенсивном световом воздействии ретинопротекторный эффект препаратов менее выражен, что возможно связано со свойством препаратов на основе биофлавоноидов накапливаться в участках с высоким содержанием свободных радикалов и играть роль донора электронов по отношению к радикальному субстрату [Плотников М.Б. и соавт., 2005].

Таким образом, чем выше активность свободнорадикального окисления, тем эффективнее препарат.

В последние годы большинство исследователей доказывают ведущую роль апоптоза в гибели клеток при повреждении сетчатки, не исключая развития некротических изменений [Marti A. et al., 1998; Carmody R.J. et al., 1999; Kueng-Hitz N. et al., 2000; Reme C.E., 2000; Grimm C. et al., 2001; J. Wu et al., 2002]. Полученные нами результаты с одной стороны свидетельствуют в пользу развития некротических изменений нейросенсорных клеток при изучаемых воздействиях, с другой стороны позволяют сделать вывод о немаловажной роли апоптоза в повреждении НСК. Известно, что для индукции апоптотической гибели клеток повреждающий стимул должен быть такой силы, чтобы клетка имела энергетические и материальные ресурсы для процессов транскрипции и трансляции проапоптотических белков [Лушников, Е.Ф., 2001; Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л., 2003].

Высокоинтенсивное световое воздействие является мощным повреждающим фактором, что свидетельствует в пользу некротической гибели НСК. Кроме того, при освещении (6000 лк) продукты деградации НСК вызывают миграцию макрофагов и микроглии, являющихся клетками воспаления. Что также говорит в пользу некротического характера гибели НСК, так как наличие воспаления является дифференциальным признаком некроза. Макрофаги и микро-

глия генерируют свободные радикалы, а микроглиоциты также секретируют провоспалительные цитокины: интерлейкин-1 и фактор некроза опухоли, запускающие каспазный механизм апоптотической гибели НСК, что вовлекает в процесс все новые и новые клетки [Srinivasan B., Roque C.H., Hempstead B.L., 2004; Zeng H., Zhu X., Zhang C. et al., 2005; Krady J.K., et al., 2005]. При длительном низкоинтенсивном световом воздействии, по-видимому, доминирующим типом смерти НСК является апоптоз. Их гибель не имеет массового характера и не вызывает миграцию фагоцитов.

Среди ультраструктурных изменений НСК уже на первые сутки после светового воздействия, а также освещения на фоне аллоксанового диабета нами были выявлены клетки с типичными признаками апоптоза – маргинация хроматина, наличие апоптотических телец в склеральных отростках радиальной глии. Хотя иммуногистохимический анализ показал отсутствие в НЯС проапоптотического гена p-53 и антиапоптотического белка bcl-2, что согласуется с литературными данными об отсутствии влияния гена p-53 на индуцированный светом апоптоз в НСК [Kueng-Hitz N. et al., 2000]. Вероятно, в индукции апоптоза здесь задействованы другие механизмы – через индукцию c-fos гена, либо активация митохондриальной ветви апоптоза [Paylor R. et al., 1994; Roffler-Tarlov S. et al., 1996; Hafezi F. et al., 1997; Marti A. et al., 1998; Kueng-Hitz N. et al., 2000; Reme C.E., 2000; Choi S. et al. 2001; Donovan M. et al., 2001; Grimm C. et al., 2001; Wu J. et al., 2002]. Существенный вклад в развитие апоптоза НСК в последнее время отводят лизосомам, индуцирующим этот процесс посредством активации фактора некроза опухоли [Tardy C. et al., 2004; Dermaut V., et al., 2005].

Пигментоэпителиоциты, находясь в тесном контакте с НСК, участвуют в утилизации разрушенных наружных сегментов. В сетчатке млекопитающих одна клетка фагоцитирует отработанные мембранные диски от 30-ти фоторецепторов [Nandrot E.F., Kim Y., Brodie S.E. et al., 2004]. В экстремальной ситуации при освещении (6000 лк) уже через сутки наблюдается усиление фагоцитарной активности (ПЭ), выражающееся повышением количества фагосом, гипертрофией апикальных микроворсинок. При световом воздействии повышается метаболическая активность ПЭ, что характеризуется увеличением количества пиноцитозных пузырьков, посредством которых осуществляется транспорт воды, лактата и других продуктов обмена от фоторецепторов к ПЭ. Так, было замечено, что освещение приводит к увеличению объема сетчатки за счет повышенного образования воды, особенно в НЯС и фотосенсорном слое [Huang V., Karwoski C.J., 1992; Li J.D. et al., 1994]. В определенный момент ПЭ не справляется с повышенной функциональной нагрузкой. Так, на 1-е сут после освещения (6000 лк) мы наблюдали эпителиоциты с деструкцией митохондрий, исчезновением микроворсинок, и ядрами с маргинально расположенным гетерохроматином, что характерно для апоптоза. По данным R.C. Geiger et al. (2005) недоокисленные продукты обмена вызывают нерепарируемые повреждения ДНК клеток, осмотический лизис органелл, в частности митохондрий, а также разрушение цитоскелета клетки, а именно актиновых микрофиламентов, большая часть которых сосредоточена в области микроворсинок.

Снижение удельной площади ПЭ в срезе сетчатки на 1-е сут после освещения наблюдались только в группе со световым воздействием на фоне гипергликемии до $3,9 \pm 0,34\%$ по сравнению с контролем ($5,43 \pm 0,09\%$, $p < 0,05$). По мнению некоторых авторов, длительная гипергликемия способствует апоптотической гибели клеток ПЭ [Turko I.V. et al., 2003]. Возможно, это связано с усилением окислительного напряжения и повышением активности индуцибельной NO-синтазы, ответственной за увеличение синтеза NO [Ellis E.A., Grant M.B., Murray F.T., et al. 1998; Chiou G.C., 2001; Du Y., Miller C.M., Kern T.S., 2003]. В присутствии супероксидного радикала NO превращается в перокснитрит, обладающий довольно значительной окислительной способностью, что приводит к нарушению многих клеточных структур, в том числе ДНК клеток [Реутов В.П., Сорокина Е.Г., 1994, 1998; Архипова М.М. и др., 2000; Roufail E. et al., 1998]. Гибель ПЭ каскадно нарастает, что приводит к срыву адаптации и появлению очагов поражения на 7-е сут после светового воздействия. Пигментоэпителиоциты уменьшаются в размерах, повышается осмиофилия ядра и цитоплазмы, в таких клетках исчезает базальная складчатость, в цитоплазме появляются мембранные комплексы. Встречаются участки с полным отсутствием пигментного эпителия и фотосенсорного слоя. Подобные изменения наблюдаются и при иных видах воздействий – коротковолновым светом, диаминофеноксипентаном, индоцианом, комбинированным воздействием ионизирующей радиации и света [Логвинов С.В., Потапов А.В., 2000; Дробатулина Д.А., 2004; Li J., et al., 1993; Wang H.M., et al., 1994; Masuda K., Watanabe I., 1995; Ikaigawa H., et al., 2005].

Деструкция ПЭ стимулирует миграцию в субретинальное пространство фагоцитов и микроглии, которые с одной стороны участвуют в удалении продуктов деградации наружных сегментов фоторецепторов, а с другой стороны сами оказывают цитотоксическое действие на ПЭ и НСК [Zhang C., Lei B., Lam T.T., 2004; Zeng H., Zhu X., Zhang C. et al., 2005].

К 14-30-м сут после освещения животных в группах без коррекции препаратами большинство ядер пигментоэпителиоцитов в очагах подвержены пикнозу, наблюдается прогрессирующее снижение удельной площади ПЭ в срезе сетчатки по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Вне очагов часть клеток сохраняет нормальное строение, часть гипертрофирована, в последних наблюдается усиление фагоцитарной активности.

Курсовое введение препаратов-антиоксидантов при световом воздействии, а особенно при освещении на фоне аллоксанового диабета способствует развитию реактивных изменений ПЭ – гипертрофии клеток и микроворсинок, усилению базальной складчатости, повышению содержания фагосом. В связи, с чем происходит увеличение удельной площади ПЭ по сравнению с показателями групп сравнения ($p < 0,05$), а на 7-е и 14-е сут после освещения на фоне гипергликемии при введении асковертина, и с контролем ($p < 0,05$). Высокая сохранность ПЭ, увеличение его фагоцитарной активности, сохранение связи между ПЭ и наружными сегментами НСК а, следовательно, улучшение транспорта метаболитов из хориоидальных сосудов сетчатки при высокоинтенсив-

ном световом воздействии и в особенности при освещении животных с аллоксановым диабетом на фоне введения препаратов, являются на наш взгляд, одними из ведущих факторов, способствующих защите рецепторной и ядродержащей части НСК от повреждения.

При сравнении удельной площади ПЭ в группах с коррекцией асковертином и каровертином отмечено достоверное увеличение данного показателя на 7 и 14-е сут после освещения на фоне гипергликемии в группе с коррекцией асковертином, что вероятно связано с более высоким содержанием в этом препарате основного антиоксиданта дигидрохверцетина, по сравнению с каровертином.

В процессах дегенерации ПЭ при длительном низкоинтенсивном световом воздействии определенную роль играет нарушение биоритмов. Известно, что сбрасывание дисков НСК и фагоцитоз их ПЭ - это циркадно-зависимый процесс, который контролируется секрецией допамина и мелатонина [Nguyen-Legros J., Hicks D., 2000; Nir I., et al., 2002]. В сетчатке крыс преобладают палочковые НСК, которые освобождаются от мембранных дисков в утренние часы, одновременно в ПЭ наблюдается активизация фагоцитарной активности, что приводит к быстрой утилизации источника свободнорадикального окисления и перекисного окисления липидов [Young, R.W. 1977; Nandrot E.F., Kim Y., Brodie S.E., 2004]. Срыв этого отлаженного механизма приводит к накоплению в субретинальном пространстве вблизи апикальной поверхности ПЭ отработанных мембранных дисков, находящихся на разных стадиях лизиса уже при освещении в течение 1 сут. Часть пигментоэпителиоцитов увеличена в размерах за счет накопления фагосом, микроворсинки гипертрофированы, усилена базальная складчатость, что говорит об активизации фагоцитоза и транспортных процессов. В некоторых клетках наблюдается срыв компенсации, и на смену реактивным приходят деструктивные изменения, которые проявляются резкой осмиофилией и вакуолизацией цитоплазмы, исчезновением микроворсинок и пикнозом ядра. Такой мозаичный характер изменений наблюдается при увеличении длительности освещения до 7-ми, 14-ти и 30-ти сут. Даже при освещении в течение 30-ти сут не обнаруживаются участки, в которых полностью отсутствует ПЭ, что отмечено при высокоинтенсивном воздействии. Обращает на себя внимание, также отсутствие существенных отличий по показателю удельной площади пигментного эпителия при освещении в течение 7-ми, 14-ти и 30-ти сут, что возможно связано с адаптацией пигментоэпителиоцитов к постоянному низкоинтенсивному воздействию.

Изменения ассоциативных нейронов ВЯС при низкоинтенсивном световом воздействии имеют обратимый характер, что характерно и для микроволнового облучения нетермогенной интенсивности [Логвинов С.В., 1993].

При освещении (6000 лк) размер и локализация очагов повреждения наружных слоев сетчатки совпадают с участками деструкции нейронов ВЯС. Вероятно, срыв механизмов антиоксидантной защиты приводит к распространению свободных радикалов и продуктов пероксидации во внутренние слои сетчатки, что вызывает повреждение мембранных органелл, восприимчивых к

окислению. Так, ультраструктурный стереометрический анализ удельной площади органелл показал снижение содержания митохондрий и эндоплазматического ретикулума в биполярных нейронах. Активизация свободнорадикального окисления и перекисного окисления липидов вызывает деструкцию высоко-мембранных структур синаптических контактов наружного сетчатого слоя. В отдельных участках он полностью отсутствует, что прерывает трехнейронную цепь и опосредованно вызывает деструкцию нейронов ВЯС, что согласуется с данными М. Wasowicz et al. (2002). По мнению этих исследователей, деструкция ассоциативных нейронов напрямую зависит от степени поражения НСК и объясняется потерей синаптического входа от них и невозможностью выхода трофических факторов и медиаторов. Максимальное содержание пикноморфных ассоциативных нейронов наблюдается на 7-е сут после освещения и совпадает по срокам с деструкцией НСК.

Среди ассоциативных нейронов наиболее подвержены деструкции амакринные нейроны. Так, количество пикноморфных амакринных нейронов при световом воздействии достигает $26,6 \pm 1,26\%$, биполярных $17,4 \pm 0,69\%$ и горизонтальных $13,6 \pm 1,24\%$, что значимо отличается контроля ($p < 0,05$). Подобные результаты наблюдались после нейтронного воздействия, микроволнового облучения, при диабете [Логвинов С.В. и соавт. 1994; Логвинов С.В., 1998; Гаджиев Р.В., 1998]. Обращает на себя внимание тот факт, что распределение ядер радиальных глиоцитов во внутреннем ядерном слое происходит неравномерно, основная часть их ядер сконцентрирована у витреального края этого слоя и находится в непосредственном контакте с телами амакринных нейронов. Отмечено, что большая часть этих глиоцитов при световом воздействии подвержена деструкции. Как известно, глия обеспечивает нормальное функционирование нейронов и ее гибель, косвенно, инициирует деструкцию нейронов. Так, например, радиальные глиоциты участвуют в метаболизме нейротрансмиттера глутамата, который в больших концентрациях обладает нейротоксичностью и индуцирует апоптатическую гибель нейронов, что наблюдается как после светового воздействия [Groshe J. et al., 1995; de Raad S. et al., 1996; Wasowicz M. et al., 2002], так и при сахарном диабете [Борисова С.А., Коломойцева Е.М., 2003; Mizutani M., 1996; Lieth-Alistair E.J. et al., 1998].

Возможно деструкция амакринных нейронов, является следствием гибели радиальных глиоцитов. Кроме того, проведенный корреляционный анализ выявил сильную зависимость между деструктивными изменениями амакринных и ганглионарных нейронов после светового воздействия интенсивностью 6000 лк. Повышение числа пикноморфных ганглионарных нейронов на 1-е сут после освещения приводит к деструкции амакринных клеток на 30-е сут ($r=0,68$). В группе с коррекцией каровертином увеличение числа пикноморфных ганглионарных нейронов на 14-е сут после освещения вызывает повышение содержания пикноморфных амакринных нейронов на 30-е сут ($r=0,65$).

Горизонтальные нейроны в меньшей степени подвержены деструкции, чем амакринные и биполярные, что вероятно связано с низким содержанием в

них мембранных органелл – основной мишени высокоинтенсивного светового воздействия [Давыдова Т.В., 1984].

Выраженная гипергликемия при сахарном диабете, активация полиолового пути метаболизма глюкозы, а также нарушение глутаматного обмена по данным литературы во многом способствует развитию деструктивных изменений нейронов внутренних слоев и их апоптотической гибели [Gamberino W.C., 1997; Choi S. et al., 2001; Tinghuai W., 2005].

По нашим данным, изменения ассоциативных нейронов при аллоксановом диабете продолжительностью 4-8 недель проявляются набуханием части митохондрий, расширением цистерн эндоплазматической сети, исчезновением полисом. Р.В. Гаджиевым [1998] после шестимесячного дитизонового диабета обнаружено, что наибольшая выраженность осциляторных потенциалов принадлежит амакринным нейронам. Этот факт позволяет предположить, что первоначальные нарушения возникают именно на их уровне.

Вероятно, суммация всех описанных выше процессов приводит к тому, что наиболее выраженные деструктивные изменения нейронов ВЯС по критерию гиперхромия со сморщиванием наблюдаются в группе после освещения на фоне аллоксанового диабета, достигая максимальных значений на 7-е сут - $24,7 \pm 0,96\%$, что в 1,2 раза выше данных при одном световом воздействии ($p < 0,05$). К 14-м и 30-м сут после освещения число деструктивно измененных нейронов снижается, и показатели в обеих группах уравниваются, что связано с фагоцитозом погибших нейронов радиальной глией.

Степень повреждения ассоциативных нейронов ВЯС в группах с использованием асковертина и каровертина значительно ниже аналогичных данных групп без коррекции, причем значения деструкции у животных после светового воздействия достоверно не отличаются от таковых в группе после освещения на фоне аллоксанового диабета. Это вероятно связано с большей сохранностью митохондрий и эндоплазматического ретикулула в цитоплазме ассоциативных нейронов сетчатки животных с коррекцией препаратами, что обнаружено при подсчете удельной площади органелл и как следствие увеличению метаболического и энергетического потенциала клеток. Так, на 1-е сут. удельная площадь гранулярной ЭПС в группах с коррекцией асковертином и каровертином достоверно выше аналогичных данных в группах без введения препаратов в 1,3 и 1,5 раза соответственно ($p < 0,05$). Возможно, это связано с ингибированием процессов перекисного окисления липидов в мембранных органеллах ассоциативных нейронов, что способствует устойчивости этих нейронов к повреждающему действию света. Угнетение препаратами на основе диквертина полиолового пути метаболизма глюкозы при сахарном диабете [Naraguchi H. et al., 1996], вероятно, является одним из механизмов защиты нейронов внутренних слоев сетчатки от повреждения, что приводит к снижению дегенерации ассоциативных нейронов и нивелирует разницу между показателями деструкции в обеих изучаемых группах.

Важную роль в повреждении ганглионарных нейронов играют нарушение микроциркуляции и деструкция астроглии. Наиболее чувствительными к гипо-

ксии органеллами являются митохондрии, что приводит к нарушению функции тканевого дыхания и развитию окислительного стресса. Выход в гиалоплазму цитохрома C, в результате разрушения митохондриальных мембран, активизирует ПОЛ, а также индуцирует апоптоз клетки. Вторым механизмом гибели ганглионаров может быть связан с нарушением нейротрофической стимуляции при повреждении зрительного нерва. Так, очаговое повреждение миелиновых оболочек и осевых цилиндров было отмечено при высоко- и низкоинтенсивном световом воздействии, при нейтронном облучении [Логвинов С.В. и соавт., 1994; Потапов А.В., 2006]. Имеются данные, что при эмбриональном развитии сетчатки выживают те ганглионарные нейроны, растущие аксоны которых контактируют с латеральным колечатым телом, где, вероятно, терминальные участки их аксонов и подвергаются стимуляции нейротрофическим фактором мозга. Те клетки, которые не получили стимуляции вышеназванным фактором, подвергаются апоптозу. Так, в эксперименте нейротрофический фактор мозга оказался наиболее действенным при защите ганглионарных нейронов сетчатки от смерти после перерезки их аксонов [Quigley H., Nickells R., Kerrigan L., 1995].

Поражение ганглионарных нейронов встречается в двух формах - это хроматоз и повышение осмиофилии со сморщиванием (пикноморфные нейроны). Эти изменения неспецифичны и встречаются при гипоксии мозга [Пугаченко Н.В., 2000], после воздействия на сетчатку ионизирующей радиации [Логвинов С.В., 1998], микроволн [Логвинов С.В. и соавт. 1994], света [Потапов А.В., 1998].

При анализе деструкции ганглионарных нейронов отмечены следующие закономерности: во-первых, при высокоинтенсивном световом воздействии ганглионарные нейроны менее подвержены деструкции, чем ассоциативные, а при низкоинтенсивном воздействии отмечается обратная динамика.

Вероятно, освещение (6000 лк) инициирует очаговую гибель наружных слоев сетчатки, что опосредованно, из-за нарушения синаптических связей, вызывает деструкцию ассоциативных нейронов. Кроме того, в ганглионарных нейронах отмечена высокая активность белка bcl-2, препятствующего апоптотической гибели этих клеток. Это, по-видимому, способствует увеличению порога чувствительности ганглионарных нейронов к действию патологических факторов.

При низкоинтенсивном освещении, вероятно, на первый план выступает нарушение трофики нейронов. По мнению M.J. Eadie et al., [1971] крупные клетки более чувствительны к гипоксии, что обусловлено большим расстоянием от периферии до центра клетки и, следовательно, менее адекватными условиями для диффузии веществ к центру клетки. Поэтому авторы полагают, что крупные нервные клетки с большим объемом цитоплазмы и высокой активностью окислительных ферментов более чувствительны к нарушению трофики, чем мелкие клетки.

Вторая отличительная особенность повреждающего действия кратковременного высокоинтенсивного и длительного низкоинтенсивного светового воз-

действия заключается в том, что после воздействия низкоинтенсивного света преобладает тотальный хроматолиз, а на ранних сроках после высокоинтенсивного воздействия в большом количестве наблюдаются пикноморфные ганглионарные нейроны.

По данным Н.Н. Боголепова [1979] хроматолитические нейроны могут переходить в осмиофильные. Вероятно, высокоинтенсивное воздействие, являясь более агрессивным фактором, чем низкоинтенсивное, минуя хроматолитическую стадию (либо она имеет место непродолжительное время) сразу приводит к сморщиванию клетки.

В зависимости от распределения и содержания хромотофильного вещества хроматолиз может быть очаговым и тотальным. Очаговый хроматолиз является обратимым изменением нейронов и отражает нарушение обмена функциональных белков. В дальнейшем он может нарастать, и в процесс вовлекаются структурные белки клеток, что приводит к развитию необратимой стадии - тотального хроматолиза. Так, уже на 1-е сут после освещения (6000 лк) наблюдается снижение удельной площади эндоплазматического ретикулума во всех экспериментальных группах, что совпадает с увеличением количества нейронов с очаговым хроматолизом. Количество нейронов с тотальным хроматолизом в эти сроки возрастает только в группе с аллоксановым диабетом до $3,65 \pm 0,4\%$, по сравнению с контролем ($1,95 \pm 0,3\%$, $p < 0,05$). В этой группе наблюдаются минимальные значения удельной площади гранулярной ЭПС и митохондрий. С одной стороны, это, вероятно, связано с усилением сосудистых нарушений, так как основной мишенью при сахарном диабете является микроциркуляторное русло [Нестеров А.П., 2000; Астахов Ю.С., Лисочкина А.Б., Шадричев Ф.Е., 2003; Antonetti Alistair D.J. et al., 1998; Meier M., King G.I., 2000]. С другой стороны авторами Р.М. Martin et al. [2004] обнаружен каспазозависимый апоптоз ганглионарных нейронов сетчатки крыс при стрептозотоциновом диабете. Предполагаемые причины апоптоза это - повышение концентрации глутамата и гомоцистеина в стекловидном теле, болеющих диабетом крыс, а также повышение активности протеинкиназы С, оксида азота и окислительный стресс [Ambati J., et al., 1997; Lieth Alistair E. et al., 1998; Kowluru R.A. et al., 2001; Moore P. et al., 2001; Kowluru R.A., 2004; Martin P.M. et al., 2004].

В дальнейшем при низкоинтенсивном воздействии наблюдается рост содержания нейронов с очаговым и тотальным хроматолизом. Обращает на себя внимание тот факт, что после освещения в течение 14 сут наблюдается снижение содержания нейронов с тотальным и очаговым хроматолизом, а содержание пикноморфных ганглионаров существенно не меняется при увеличении продолжительности воздействия. Возможно, это связано с фагоцитозом погибших нейронов и восстановлением клеток с очаговым хроматолизом. Снижение количества нейронов с тотальным хроматолизом и отсутствие динамики в содержании пикноморфных ганглионаров может быть связано с адаптацией нейронов к изменению трофики.

При освещении (6000 лк) мы наблюдали динамику изменения содержания деструктивных нейронов также через 7, 14 и 30 сут после воздействия. Макси-

мальное увеличение содержания нейронов с тотальным хроматолизом наблюдается на 14-е сут после освещения в очагах поражения, а к 30-м сут происходит снижение этого показателя за счет фагоцитоза погибших клеток. Большинство сохранившихся нейронов характеризуются морфологическими признаками компенсаторно-приспособительных реакций, выражающихся в гипертрофии клеток, активации ядрышка, усилением складчатости ядерной мембраны, увеличению удельной площади гранулярной ЭПС и митохондрий. Вне очагов изменения ганглионарных нейронов во всех группах незначительны.

Применение асковертина и каровертина приводит к значительному снижению процентного содержания нейронов с очаговым, тотальным хроматолизом, а также пикноморфных, что в некоторой степени может быть связано с увеличением активности антиапоптотического белка bcl-2, которая в несколько раз превышает активность проапоптотического гена p-53. К 30-м сут после освещения (6000 лк) при введении препаратов содержание нейронов с тотальным хроматолизом значимо не отличается от контрольных значений, а удельная площадь гранулярной ЭПС увеличивается как по сравнению с данными на 1-е сут, так и с соответствующими группами без коррекции. В группах же с аллоксановым диабетом степень патологических изменений нейронов несколько выше, но все же достоверно отличается от показателей группы без использования препаратов. Меньшая чувствительность мультиполярных нейронов ганглионарного слоя сетчатки крыс к изучаемым нами экспериментальным воздействиям на фоне применения асковертина и каровертина, вероятно объясняется улучшением кровоснабжения внутренних слоев сетчатки. А также сохранностью метаболических процессов, связанной с более высокой удельной площадью органелл и синаптических связей между клетками, образующими трехнейронную цепь сетчатки, по сравнению с группами без использования препаратов.

Большое значение в развитии структурных изменений сетчатки при одностороннем высокоинтенсивном световом воздействии, а также освещении на фоне аллоксанового диабета имеет повреждение межнейрональных связей, так как степень повреждения синаптического пула, а также способность к восстановлению поврежденных и образованию новых синаптических контактов во многом определяет сохранность нейронной популяции сетчатки.

Высокая повреждаемость синапсов при данных воздействиях очевидна в связи с большим содержанием в отростках нейронов мембранных образований. По данным В. Razdan et al. [1993], мембраны пре- и постсинаптических отделов при активации в них перекисного окисления липидов повреждаются сильнее, чем мембраны других участков нейронов. Воздействие света приводит также к накоплению Ca^{2+} в цитоплазме нервной клетки, вследствие чего происходит дестабилизация синаптических мембран и активация протеолитических ферментов и Ca^{2+} -зависимой протеинкиназы, блокирующих энергетические системы синапсов [Edwards D.F. et al., 1991; Li J. et al., 1991; Razdan B et al., 1993; Kristian T. et al., 1994]. Первоначальная реакция синапсов на любое экстремальное воздействие неспецифична и проявляется в виде набухания отростков, дезагре-

гации синаптических везикул, отека митохондрий, т.е. изменения контактов по светлomu типу [Боголепов Н.Н., 1979; Семченко В.В., Боголепов Н.Н., Степанов С.С., 1995; Семченко В.В., Степанов С.С., Сергеева Е.Д., 1995; Семченко В.В., Боголепов Н.Н., Степанов С.С. и др., 2005], что мы наблюдали, как при высоко-, так и при низкоинтенсивном световом воздействии. Аналогичные изменения описаны многочисленными авторами и при других видах экспериментальных воздействий – после острой гипоксии, при действии токсических веществ, нейтронном облучении, рентгеновском и световом воздействии [Фельдман Н.Г., Вендило М.В., 1976; Боголепов Н.Н., 1979; Антипов В.В. и др., 1987; Абдрахманов А.А., 1987; Потапов А.В., Логвинов С.В., 1999; Пугаченко Н.В., 2000].

При высокоинтенсивном световом воздействии и освещении на фоне аллоксанового диабета к 30-м сут в очагах поражения степень дегенеративных изменений синапсов нарастает, в большом количестве появляются контакты, измененные по темному типу, это в первую очередь связано с состоянием нейронов, регулирующих скорость аксонального тока. Выраженность нарушений транспорта молекул играет существенную роль в степени деструкции пре-синаптических отделов и влияет на их способность к репарации [Боголепов Н.Н., 1979]. С другой стороны выраженная деструкция синапсов по сравнению с нейронами является своеобразной защитной реакцией, обеспечивающей в некоторой степени сохранность нейронов и их способность к структурно-функциональному обновлению [Боголепов Н.Н., 1979].

Количественное исследование активных зон синапсов с помощью контрастирования ФВК через 7 сут после освещения (6000 лк), как в группах без использования препаратов, так и в группах с коррекцией, свидетельствует о значительном снижении общей численной плотности контактов в условной единице площади неврoпилия в основном за счет деструкции асимметричных положительно и отрицательно изогнутых синапсов, т.е. зрелых активно функционирующих [Семченко В.В., Боголепов Н.Н., Степанов С.С., 1995]. Аналогичную динамику наблюдали при экспериментальной ишемии мозга [Семченко В.В., Степанов С.С., Сергеева Е.Д., 1995; Логвинов С.В., Пугаченко Н.В. и др., 2001]. Аллоксановый диабет усиливает фотоповреждение синаптического аппарата сетчатки. Данный эффект, возможно, связан с наличием общих патогенетических механизмов.

Весьма существенным оказывается изменение системы субсинаптических единиц – снижение высоты, размытость контуров и неравномерность прокрашивания плотных проекций. Это свидетельствует о протеолитической деструкции данных филаментозных образований и нарушает синаптическую передачу при нормальной структуре синаптических везикул [Акерт К., 1972; Степанов С.С., 1986; Семченко В.В., Боголепов Н.Н., Степанов С.С., 1995; Семченко В.В., Степанов С.С., Сергеева Е.Д., 1995]. К факторам, вызывающим перестройку субсинаптических единиц, относят внутриклеточную аутоинтоксикацию, активацию гидролитических ферментов, перекисное окисление липидов и метаболический ацидоз [Семченко В.В., Степанов С.С., 1987]. Во всех группах

на 7-е сут после освещения уменьшается количество синапсов типа А с высотой плотных проекций > 60 нм и С с высотой плотных проекций < 50 нм. Длина активной зоны контакта является отражением его функциональной активности и может меняться, изменяя при этом и высоту плотных проекций [Carverley R.K.S. et al., 1990], что свидетельствует о пластичности синаптического аппарата. Функционально активными являются только асимметричные синапсы. Симметричные контакты относят к своеобразному “депо”. Эти контакты под действием определенных факторов могут преобразоваться в асимметричные [Логвинов С.В. и др., 1994; Семченко В.В., Боголепов Н.Н., Степанов С.С., 1995].

На 7-е сутки после высокоинтенсивного воздействия во всех группах преобладают синапсы с длиной АЗК 200-300 мкм и 300-500 мкм, что является компенсаторно-приспособительной реакцией синапсов на повреждение, что особенно ярко выражено в группах с коррекцией. Реорганизация синаптической популяции возможна путем восстановления структуры и функции синапсов, их новообразованием, а также усложнением организации синаптических контактов, что было доказано на модели гипоксии головного мозга [Боголепов Н.Н., 1979; Семченко В.В., Степанов С.С., 1997]. Однако в отличие от коры головного мозга при восстановлении синаптического пула после повреждения в сетчатке не происходит усложнения межсинаптических связей. В частности, отсутствуют сложные гипертрофированные и перфорированные синапсы, наличие которых говорит об усилении информативности сохранившихся контактов. Это связано с возможностью одномоментного выделения нейромедиатора сразу несколькими синаптическими пузырьками [Семченко В.В., Степанов С.С., 1997].

Восстановление синаптического пула сетчатки при фотоповреждении происходит за счет созревания незрелых контактов и появления синапсов ювенильного типа, являющихся своеобразным синаптическим депо, что также отмечено при ишемическом поражении коры больших полушарий и после микроволнового облучения сетчатки [Логвинов С.В., 1994; Семченко В.В., Боголепов Н.Н., Степанов С.С., 1995]. К 30-м сут после освещения заметно увеличивается количество мелких новообразованных синапсов с АЗК менее 100 мкм и 100-200 мкм.

После освещения при введении асковертина увеличивается численная плотность асимметричных синапсов за счет плоских неактивных контактов, что, вероятно, происходит из-за созревания симметричных синапсов, поэтому общая численная плотность синапсов меняется незначительно. Наиболее выраженный протективный эффект наблюдался после курсового введения каровертина, что стимулировало неосинаптогенез, созревание незрелых синапсов, а также гипертрофию сохранившихся контактов. Эффект антиоксидантов вероятно связан во-первых, с мембраностабилизирующим действием, во-вторых, с большей сохранностью нейронов, что отмечено в сетчатках животных, получавших лечение, в-третьих, с положительным влиянием препаратов на реологию крови, так как наряду с нейронами синаптические контакты наиболее чувствительны к недостатку кислорода [Боголепов Н.Н., 1972].

Изменение синаптоархитектоники сетчатки после длительного низкоинтенсивного освещения в течение 7-ми сут имеет адаптивный характер и сопровождается сохранением численной плотности контактов, а также реорганизацией с сохранением зрелых синапсов с длиной АЗК 300-500 мкм и 500-700 мкм. После освещения в течение 30 сут наблюдается срыв адаптации, проявляющийся снижением численной плотности контактов. Введение препаратов-антиоксидантов стабилизирует синаптоархитектонику сетчатки, препятствует снижению численной плотности синапсов и срыву адаптации. Как и при высокоинтенсивном воздействии, наиболее эффективным является каровертин. Он в большей степени способствует сохранению активно функционирующих искривленных синапсов.

По аналогии с наружными слоями сетчатки, где НСК и ПЭ образуют единую функциональную систему, во внутренних слоях сетчатки подобием такой системы является глионейрональный комплекс, где осуществляются двусторонние коммуникативные связи. Среди глиальных элементов в сетчатке встречаются олигодендроглиоциты - в слое нервных волокон, микроглиоциты - во внутренних слоях сетчатки, астроглиоциты - по ходу кровеносных сосудов и в области диска зрительного нерва. Основным видом глии является радиальная глия, пронизывающая все слои сетчатки и образующая наружную и внутреннюю пограничные мембраны. В отличие от нейронов глия обладает пролиферативной способностью, поэтому при патологии сетчатки возможны как регрессивные, так и прогрессивно-пролиферативные изменения радиальной глии.

В патологических условиях, вызванных световым воздействием, ишемией, а также при эпилепсии наблюдается повышенная стимуляция нейронов, которые выпускают большие количества глутамата и калия [Glass M., Dragunow M., 1995; Nicholson C., Sykov E. 1998; Uckermann O. et al., 2004]. Одной из функций радиальной глии является удаление избытка калия и глутамата из сетчатки. В условиях повышенной нагрузки этот процесс нарушается, что приводит к отеку глиоцита [Uckermann O. et al., 2004]. Так, во всех экспериментальных группах, как при низко-, так и при высокоинтенсивном световом воздействии (в ранние сроки) наблюдался отек склеральных отростков радиальной глии. Витреальные отростки задействованы в меньшей степени, так как находятся в слоях сетчатки, которые менее всего вовлечены в патологический процесс. Помимо этого, глутамат активирует АМРА-каинатные рецепторы, что приводит к поступлению натрия в ассоциативные и ганглионарные нейроны и их набуханию [Uckermann O. et al., 2004]. Так, при высоко- и низкоинтенсивном световом воздействии, а также при освещении на фоне аллоксанового диабета наблюдались отечные "светлые" клетки во ВЯС и ганглионарном слое. По данным [Sztrihai L., 1986; Olson J.E. et al., 1990; Nagelhus E.A. et al., 1993] радиальные глиоциты более склонны к набуханию, чем нейроны, так как они осуществляют транспорт воды, образующийся в результате функционирования нейронов. Этот транспорт происходит благодаря водным каналам, образованным аквапорином-4, встроенным в плазмолемму глиоцитов, далее вода удаляется либо через стекловидное тело, либо через интратретинальные кровеносные

сосуды [Nagelhus E.A. et al., 1998]. Помимо отека в радиальных глиоцитах наблюдается деструкция органелл, что с одной стороны может быть связано с гипоксией, вследствие нарушения микроциркуляции, которая приводит к образованию свободных радикалов и усилению ПОЛ, мишенью которых являются мембраны органелл. С другой стороны - прямым действием свободных радикалов, проникших во ВЯС сетчатки, будучи не нейтрализованными, в ее наружных слоях. Грубые нарушения липопротеидных комплексов мембран приводят к потере клеткой воды и сморщиванию, что сопровождается конформационными изменениями белков клетки. Это выражается в повышении осмиофилии цитоплазмы и кариоплазмы при продолжающемся уменьшении органелл.

Так, уже на 1-е сут во всех экспериментальных группах наблюдалось увеличение содержания пикноморфных радиальных глиоцитов. Максимальное их содержание отмечено на 7-е сут при освещении (6000 лк) - $29,5 \pm 0,51\%$ в группе со световым воздействием и $28,1 \pm 0,85\%$ при освещении на фоне гипергликемии (контроль $2,65 \pm 0,13\%$, $p < 0,05$), что совпадает со временем образования очагов в наружных слоях сетчатки. Очевидно, в эти сроки происходит срыв адаптации, и распространение патологического процесса во внутренние слои сетчатки. На 14-е и 30-е сут после воздействия отмечается снижение количества пикноморфных глиоцитов, связанное с их утилизацией фагоцитами.

Через 6 недель после введения аллоксана увеличивается содержание дегенеративно измененных радиальных глиоцитов, достигая максимальных значений на 8-ой неделе, что возможно связано с усилением сосудистых нарушений, играющих ведущую роль в патогенезе диабетической ретинопатии

Как было сказано выше, помимо деструктивных изменений наблюдается пролиферативная активность радиальной глии. По данным D.G. Puro et al., (1989) активирует пролиферацию глии повышенный вход в клетку ионов кальция, что наблюдается при световом воздействии [Newman E.A., 2005]. Проллиферативная активность проявляется в виде митотического деления, а также удлинения и гипертрофии отростков. Выраженная глиальная пролиферация наблюдается на 7-е сут после высокоинтенсивного светового воздействия и выражается в прорастании склеральных отростков в наружные слои сетчатки и замещении погибших НСК в очагах поражения. Данный факт можно рассматривать как адаптивную реакцию, направленную на защиту неизмененных клеток от действия свободных радикалов. Доказано, что чем больше очаг поражения при действии высокоинтенсивного света, тем значительнее глиальная пролиферация [Дробатулина Д.А., 2004]. Сохранившиеся НСК, а также ассоциативные нейроны окружены многослойными глиальными пластинами, что, возможно, является на начальных этапах компенсаторно-приспособительной реакцией. Это связано с выделением радиальными глиоцитами нейротрофических факторов, стимулирующих внутриклеточную репарацию нейронов [Harada T. et al., 2002; Zeiss C.J., Johnson E.A., 2004; Gauthier R. et al., 2005]. Косвенным признаком усиления митотической активности может служить повышение глионейронального индекса во всех экспериментальных группах по сравнению с контролем и с данными на первые сутки.

Применение асковертина и каровертина снижает степень деструкции радиальных глиоцитов, особенно после одного светового воздействия, что, вероятно, объясняется антиоксидантами и мембраностабилизирующими свойствами препаратов, препятствующих деструктивным изменениям органелл и сохраняющих метаболическую и пролиферативную активность радиальных глиоцитов. Наибольший положительный эффект наблюдается после светового воздействия на фоне введения асковертина, причем в этой группе отмечается достаточно медленная динамика роста содержания пикноморфных глиоцитов, их максимальные значения наблюдаются лишь к 30-м сут после воздействия. В этой же группе к 30-м сут наблюдается максимальное повышение по отношению к контролю показателя глионейронального индекса до $0,67 \pm 0,02\%$ (контроль $0,37 \pm 0,007\%$, $p < 0,05$). Это возможно, связано с одной стороны с фагоцитозом погибших ассоциативных нейронов, с другой – увеличением пролиферативной активности радиальной глии, что способствует развитию компенсаторно-приспособительных механизмов сетчатки в ответ на повреждение. При низкоинтенсивном воздействии ретинопротекторный эффект отмечен после 1 и 7 сут освещения.

Олигодендроглиоциты в слое нервных волокон и астроциты по ходу витреально расположенных кровеносных сосудов в ранние сроки после всех воздействий характеризуются изменениями реактивного характера, выражающимися отеком, деструкцией крист митохондрий и расширением цистерн эндоплазматического ретикулума. В более поздние сроки обнаруживаются глиоциты с дегенеративными изменениями в виде повышения осмиофилии цитоплазмы и пикноза ядра. Обращает на себя внимание однотипность деструктивных изменений астроцитов и ганглионарных нейронов, находящихся в близком контакте друг с другом. Вероятно, патологические изменения глиальных клеток приводят к прогрессирующему нарушению трофики нейронов, что в конечном итоге вызывает их гибель.

От состояния кровотока и степени повреждения сосудов, а также других элементов гематоретинального барьера при изучаемых экспериментальных воздействиях напрямую зависят характер патологических изменений и репаративный потенциал структурных элементов сетчатки.

Обнаружено, что наиболее восприимчив к повреждающему действию света и диабета наружный отдел ГРБ, образованный эндотелием хориокапилляров, мембраной Бруха и пигментным эпителием, нежели внутренний его отдел, состоящий из эндотелия с базальной мембраной интратретинальных капилляров и отростков радиальной и астроцитарной глии. Так, при сахарном диабете отмечено усиление проницаемости наружного отдела гематоретинального барьера, связанное с дисфункцией эндотелия [Qaum T. et al., 2001; Cheung A.K.H. et al., 2005; El-Remessy A.B., Al-Shabrawey M., Khalifa Y., 2006]. Ведущую роль в увеличении проницаемости ГРБ отводят активации эндотелиального фактора роста VEGF [Amin R.H. et al., 1997, Qaum T. et al., 2001; Cheung A.K.H. et al., 2005]. Кроме того, хориокапилляры находятся в непосредственной близости от источника свободных радикалов и продуктов ПОЛ - НСК. При повышенной

световой нагрузке происходит срыв адаптации и окислительное повреждение эндотелиоцитов. Так, P. Kayatz et al. (1999) обнаружили транспорт продуктов пероксидации в хориокапилляры от НСК. T. Wu et al. (2005) после освещения зеленым светом интенсивностью 3500 lx в течение 3 ч выявили окислительное повреждение ДНК эндотелиоцитов, перицитов и пигментоэпителиоцитов.

В ранний период после светового воздействия, а также освещения на фоне гипергликемии эндотелиоциты капилляров подвергаются отеку цитоплазмы, вакуолизации большинства органелл. Описанные ультраструктурные изменения сосудов сетчатки неспецифичны и наблюдаются также при других видах экспериментальных воздействий: микроволн, гамма - и нейтронном облучении, комбинированном воздействии высокоинтенсивного света и ионизирующего облучения [Абдрахманов А.А. и др., 1985; Буймова Н.П., 1993; Давыдов Г.А., Ушаков И.Б., 1987; Логвинов С.В., 1993; Логвинов С.В. и др., 1994; Дробатулина Д.А., 2004; Потапов А.В., 2006]. Дисфункция эндотелия нарушает транспорт метаболитов в ПЭ и обратный транспорт продуктов обмена. Это приводит к их накоплению в цитоплазме клетки и гибели пигментоэпителиоцитов. Также, повреждение эндотелия стимулирует тромбообразование [Yamashiro K., Tsujikawa A., Ishida S., 2003]. Тромбоциты выделяют воспалительные цитокины, вызывая хемотаксис лейкоцитов, те в свою очередь индуцируют апоптоз эндотелиоцитов. Свободные радикалы и продукты ПОЛ увеличивают ригидность мембран эритроцитов и снижают их способность к деформации, что приводит к их задержке в микроциркуляторном русле [Плотников М.Б и др., 2005]. Все перечисленные процессы вызывают увеличение удельной площади сосудов со стазом, сладжем форменных элементов и тромбозом сосудов, а также снижение количества открытых сосудов уже на 1-е сут после высокоинтенсивного и длительного низкоинтенсивного светового воздействия.

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. Экспериментальный диабет усиливает фотоповреждение сосудов хориоидеи, способствует увеличению доли сосудов с тромбозом, а также со стазом и сладжем форменных элементов и снижению открытых неизмененных сосудов. Данный эффект связан с развитием диабетической микроангиопатии, характерными морфологическими признаками которой являются деструкция эндотелия и перицитов, утолщение базальной мембраны, появление аневризм, а также нарушение реологических свойств крови. К механизмам, вызывающим эти нарушения, относят неферментативное гликозилирование белков, возрастание активности протеинкиназы С и альдозоредуктазы, изменении метаболизма липидов, активности ростовых факторов, развитие окислительного стресса и тканевой гипоксии [Qaum T. et al., 2001; EI-Remessi A.B. et al., 2003; Moore T.C.V. et al., 2003; Cheung A.K.H. et al., 2005; Marneros A.G. et al., 2005].

В очагах поражения на 7-е сут после высокоинтенсивного светового воздействия, помимо НСК деструктивные изменения затрагивают ПЭ и мембрану

Бруха. Встречаются участки, в которых отсутствуют все наружные слои сетчатки, и ассоциативные нейроны ВЯС оказываются вплотную приближены к мембране Бруха. В области дефектов базального комплекса наблюдаются сосудистые почки, что сопровождается прорастанием новообразованных сосудов хориоидеи в сетчатку. В участках, окружающих дефект, наблюдается усиленная пролиферация ПЭ. Обнаружено, что в ПЭ синтезируются два фактора-антагониста. Фактор роста ПЭ (PEDF) ингибирует ангиогенез [Dawson D.W., Volpert O.V., Gillis P., 1999; King G.L. et al., 2002] и выделяется через апикальную часть клетки, так как обладает еще нейротропным действием. Фактор роста эндотелиоцитов (VEGF) при нормальных условиях функционирования выделяется в небольших количествах через базальную часть ПЭ и стимулирует активность эндотелия хориоидеи [Blaauwgeers H.G. et al., 1999; Vecerra S.P. et al., 2004].

Очевидно, в патологических условиях нарушается баланс, и VEGF начинает выделяться в больших количествах, кроме того, гипоксия индуцирует экспрессию HIF-1 α фактора, что инициирует неоангиогенез [Zeng Y. et al., 2007]. По данным D.N. Ausprunk et J. Folkman (1977) в новообразованных сосудах практически отсутствует базальная мембрана. Они очень хрупкие и легко кровоточат. Мы наблюдали новообразованные сосуды, их базальная мембрана очень тонкая, но сохраняется на всем протяжении. Возможно, увеличение проницаемости таких сосудов связано с отсутствием глиальных отростков, участвующих в образовании гематоретинального барьера. По данным некоторых авторов при фотоповреждении источником образования новых сосудов является внутренняя сосудистая сеть сетчатки, причем они содержат фенестрированный эндотелий [Bellhorn R.W. et al., 1980; Korre G.E. et al., 1983]. Однако мы отчетливо наблюдали прорастание сосудов из хориоидеи.

Наибольшая сохранность ГРБ во внутренних слоях сетчатки, вероятно, связана с защитными свойствами радиальной и астроцитарной глиии, которые выделяют трофические факторы, уменьшающие деструкцию эндотелия [Yamada H. et al., 2000], а также с относительной удаленностью от НСК - основного источника свободных радикалов и продуктов ПОЛ.

Использование асковертина и каровертина приводит к снижению площади тромбированных и увеличению открытых сосудов хориоидеи, что связано с улучшением реологических свойств крови. В первую очередь препараты, проявляя антиоксидантное действие, вероятно, улучшают показатели клеточной реологии. Они восстанавливают свободные радикалы, защищая мембраны форменных элементов крови от свободнорадикального окисления, улучшают деформируемость эритроцитов.

Математическое моделирование проводилось при помощи методов, реализованных в программной среде mathCAD (интерполяция, регрессия, аппроксимация). За основу брали экспериментальные данные, полученные в ходе эксперимента, проводили сплайн-интерполяцию для создания интерполяционных кривых. В последующем подбирали выражение путем сопоставления определенной функции каждому участку кривой, так, чтобы, полученная система

уравнений удовлетворительно аппроксимировала экспериментальные данные. Эту задачу решали при помощи метода обобщенной линейной регрессии. В результате проведенной работы было показано, что содержание деструктивных НСК, пикноморфных нейронов и радиальной глии при световом воздействии на фоне аллоксанового диабета и коррекции асковертином и каровертином описывается следующей формулой:

$$y(t) := \text{асоеf}_0 \cdot t^2 + \text{асоеf}_1 \cdot t + \text{асоеf}_2 \cdot t^3 + \text{асоеf}_3 \cdot e^{\frac{t}{10}}$$

$y(t)$ - количество пикноморфных клеток;

асоеf_i - коэффициенты полученные при моделировании (для соответствующего пула клеток);

t - время экспериментального воздействия

Таблица. 2 Коэффициенты для пикноморфных нейронов и глии.

Вид клеток	Асоеf 0	Асоеf 1	Асоеf 2	Асоеf 3
Свет 6000 лк				
НСК	263,747	-33,022	-236,838	14,24
Ассоциативные нейроны	10,897	-1,376	-8,464	0,517
Ганглионарные нейроны	14,746	-1,667	-12,264	0,509
Радиальная глия	18,854	-2,371	-9,912	0,626
Свет (6000 лк) + каровертин				
НСК	11,104	-1,655	-6,656	0,601
Ассоциативные нейроны	47,558	-6,055	-41,669	2,666
Ганглионарные нейроны	17,244	-2,327	-14,293	1,084
Радиальная глия	-2,418	-0,285	9,244	0,338
Свет (6000 лк) + асковертин				
НСК	6,082	-1,044	-2,445	0,426
Ассоциативные нейроны	10,155	-4,985	13,652	3,004
Ганглионарные нейроны	-6,447	-0,219	12,153	0,377
Радиальная глия	21,91	-4,567	-0,662	1,861
Диабет + свет (6000 лк)				
НСК	342,809	-41,554	-301,396	15,421
Ассоциативные нейроны	22,746	-5,005	-4,896	2,447
Ганглионарные	12,495	-1,73	-8,978	0,751

нейроны				
Радиальная глия	-16,831	0,666	31,451	-0,562
Диабет + свет (6000 лк) + каровертин				
НСК	-0,881	-1,159	9,23	0,711
Ассоциативные нейроны	39,174	-5,191	-33,31	2,386
Ганглионарные нейроны	8,764	-1,393	-5,3	0,661
Радиальная глия	47,84	-5,56	-34,976	1,496
Диабет + свет (6000 лк) + асковертин				
НСК	9,335	-1,8	-3,147	0,815
Ассоциативные нейроны	87,727	-10,843	-70,936	4,113
Ганглионарные нейроны	15,177	-2,174	-11,714	1,069
Радиальная глия	-8,851	0,115	14,515	0,121
Свет 200 лк				
НСК	-0,911	0,129	1,202	-0,087
Ассоциативные нейроны	9,122	-1,281	-7,251	0,642
Ганглионарные нейроны	-4,233	0,393	6,23	-0,094
Радиальная глия	3,994	-1,971	6,376	1,288
Свет (200 лк) + каровертин				
НСК	-0,604	0,093	0,942	-0,078
Ассоциативные нейроны	6,352	-0,978	-4,584	0,525
Ганглионарные нейроны	6,43	-1,062	-3,691	0,473
Радиальная глия	-1,966	-0,198	7,22	0,204
Свет (200 лк) + асковертин				
НСК	-1,366	0,112	1,741	-0,02
Ассоциативные нейроны	6,899	-1,049	-5,079	0,555
Ганглионарные нейроны	-1,255	-0,14	3,502	0,091
Радиальная глия	5,887	-1,218	0,48	0,5
Диабет + свет (200 лк)				
НСК	5,398	-0,603	-4,525	0,179
Ассоциативные нейроны	6,306	-0,986	-4,48	0,535
Ганглионарные нейроны	-6,575	0,067	10,536	0,175

Радиальная глия	-26,859	1,031	37,807	0,405
Диабет + свет (200 лк) + каровертин				
НСК	5,791	-0,743	-4,847	0,306
Ассоциативные нейроны	7,227	-1,102	-5,317	0,59
Ганглионарные нейроны	8,016	-1,256	-5,556	0,626
Радиальная глия	4,266	-1,925	5,109	1,341
Диабет + свет (200 лк) + асковертин				
НСК	3,178	-0,416	-2,518	0,187
Ассоциативные нейроны	5,833	-0,965	-3,942	0,55
Ганглионарные нейроны	-2,646	-0,157	6,104	0,15
Радиальная глия	4,919	-1,109	0,608	0,629

Данная модель является универсальной для сетчатки и позволяет с высокой степенью вероятности оценить состояние того или иного пула клеток в конкретные моменты времени на протяжении всего эксперимента, а также прогнозировать их изменения на определенном отрезке времени.

Анализ кривых показал волнообразный характер изменения содержания деструктивных клеток сетчатки при всех видах воздействия, а также в группах с коррекцией. При прогнозировании изменений обращает на себя внимание закономерный рост деструкции при увеличении времени после высокоинтенсивного светового воздействия и усиление повреждения при увеличении длительности низкоинтенсивного светового воздействия. В нейрональной популяции сетчатки при световых (200 лк, 6000 лк) воздействиях, а также освещении на фоне аллоксанового диабета наиболее поражаемыми являются НСК, а нейроны внутренних слоев сетчатки менее чувствительны к указанным воздействиям. Причем при низкоинтенсивном световом воздействии достоверные отличия от контрольной группы ($p < 0,05$) по показателю деструкции ассоциативных нейронов появляются только при увеличении продолжительности освещения до 40-а суток. Реакция радиальной глии при высокоинтенсивном световом воздействии характеризуется деструкцией, совпадающей по срокам с гибелью ассоциативных нейронов, а при длительном низкоинтенсивном световом воздействии значительно опережает дегенерацию нейронов. Введение препаратов антиоксидантов предупреждает деструктивные изменения нейронов и глии сетчатки, о чем свидетельствуют более низкие показатели деструкции нейронов и глии по сравнению с данными групп без коррекции.

На основании вышеизложенного нам представляется следующая схема патоморфогенеза сетчатки при световом воздействии на фоне аллоксанового диабета и коррекции антиоксидантами асковертином и каровертином (рис. 1). Обращает на себя внимание общность механизмов повреждения сетчатки при данных экспериментальных воздействиях, что в совокупности дает усиление деструктивного эффекта при их комбинации. Это, во-первых, активация сво-

боднорадикального (СРО) и ПОЛ, во-вторых, гипоксия сетчатки, связанная с патологическими изменениями микроциркуляторного русла. Первой мишенью при воздействии света являются НСК, а именно их наружные сегменты - основные акцепторы световых лучей. В экстремальных ситуациях, будь то слишком яркое или продолжительное освещение, в них активируются процессы СРО и ПОЛ. Продукты перекисидации вызывают повреждение мембранных и ядерных структур НСК, а также ПЭ, осуществляющего антирадикальную защиту. Срыв защиты, приводит к распространению свободных радикалов и продуктов перекисидации, как в сторону хориоидеи, вызывая гибель эндотелиоцитов, с последующим тромбообразованием, так и во внутренние слои сетчатки, повреждая мембранные структуры синапсов и радиальных глиоцитов. Следствием описанных событий является нарушение межнейрональных и глионейрональных связей, что вызывает деструкцию ассоциативных и ганглионарных нейронов.

Аллоксановый диабет в ранние сроки приводит к поражению микроциркуляторного русла, что характеризуется деструкцией перицитов и эндотелиоцитов, утолщением базальной мембраны, а также нарушением реологических свойств крови. Нарушение микроциркуляции приводит к развитию стойкой гипоксии, стимулирующей выработку свободных радикалов, повреждающих глиальные элементы сетчатки, а также ассоциативные и ганглионарные нейроны.

Таким образом, во внутренних слоях сетчатки обнаружена "точка пересечения" повреждающих эффектов света и аллоксанового диабета. В наружных слоях сетчатки мишенью для обоих видов воздействия является наружный отдел ГРБ. Повреждение его компонентов приводит к тромбозу сосудов с образованием ишемических зон сетчатки, что при освещении (6000 лк) приводит к очаговому выпадению наружных слоев сетчатки, так как их питание осуществляется только за счет сосудов хориоидеи. Кроме того, гипоксия вызывает неоваскуляризацию, следствием чего является усиление дегенерации НСК, нарушение межнейрональных связей, дегенеративные изменения радиальных глиоцитов и нейронов внутренних слоев сетчатки.

Антирадикальная активность асковертина и каровертина способствует снижению указанных выше деструктивных изменений. Однако более выраженный протективный эффект препаратов в отношении данных структур отмечен больше в группе с изолированным световым воздействием, что, вероятно, связано с различием в механизмах, ведущих к образованию высокоактивных радикалов при световом воздействии и аллоксановом диабете. Свет непосредственно запускает механизмы фотоокисидации, а гипергликемия приводит к снижению активности антиоксидантных систем, растормаживая выработку свободных радикалов [Островский М.А., Федорович И.Б., 1982; Можеренков В.П., Калинин А.П., 1991; Кондратьев Я.Ю. и др, 1998; Noell W. K. et al., 1966; Varinara M., 1995]. Основной мишенью антиоксидантов являются легкоокисляемые субстраты – радикалы, а на антиоксидантную систему он влияния не оказывает, что несколько снижает его протективный эффект у животных с аллоксановым диабетом [Плотников М.Б. и др., 2005].

Существенным в защите сетчатки от повреждения при использовании антиоксидантов, оказалась высокая сохранность ПЭ – важного звена в антирадикальной и антигипоксической защите сетчатки, что способствует меньшему повреждению НСК, синапсов, радиальных глиоцитов и эндотелиоцитов хориокапилляров. Это приводит к сохранению межнейрональных и глионейрональных связей и как следствие, защите ассоциативных и ганглионарных нейронов, а также препятствует структурно-функциональным нарушениям ГРБ и процессам неоангиогенеза. Кроме того, препараты асковертин и каровертин оказывают положительное влияние на показатели клеточной реологии, улучшая вязкоэластические свойства крови, вызывая антиагрегационное и капилляропротекторное действие, а также ограничивают свободнорадикальные процессы и ингибирует альдозоредуктазу, что приводит к улучшению состояния микроциркуляции, снижению гипоксии.

ВЫВОДЫ

1. Сочетанное действие света и аллоксанового диабета на сетчатку значительно отличается от эффектов, вызываемых каждым фактором в отдельности, и зависит от интенсивности освещения и продолжительности действия факторов. Максимальная выраженность деструкции при аллоксановом диабете характерна для глиально-сосудистого комплекса, а при световом воздействии - для нейросенсорных клеток и пигментного эпителия сетчатки. При высокоинтенсивном освещении на фоне аллоксанового диабета отмечен синергический эффект по критерию деструкции нейросенсорных клеток.
2. Изменения нейрональной популяции сетчатки при высокоинтенсивном световом воздействии и освещении на фоне гипергликемии характеризуются деструкцией закономерно убывающей в ряду НСК - ассоциативные нейроны - ганглионарные нейроны. Очаги деструкции НСК при освещении (6000 лк) замещаются быстро пролиферирующими отростками радиальной глии. При длительном низкоинтенсивном световом воздействии деструкция НСК не имеет массового характера, а компенсаторно-приспособительные процессы характеризуются репарацией наружных отростков фоторецепторов.
3. Изменения нейронов внутренних слоев сетчатки при световом воздействии (6000 лк) и освещении на фоне гипергликемии совпадают по срокам, локализации и динамике с дегенерацией НСК. Наибольшей деструкции подвержены амакринные нейроны, а наименьшей - горизонтальные. При длительном низкоинтенсивном освещении изменения ассоциативных нейронов имеют обратимый характер и проявляются только на ультраструктурном уровне.
4. Межнейрональные связи высокочувствительны к световому воздействию и освещению на фоне аллоксанового диабета, о чем свидетельствует их ранняя деструкция и снижение общей численной плотности преимущественно за счет асимметричных контактов. Реорганизация межнейронных связей характеризуется неосинаптогенезом и созреванием контактов ювенильного типа, что является отражением адаптации при сокращении нейрональной популяции.

5. Деструкция радиальной глии при высокоинтенсивном освещении совпадает по срокам с гибелью ассоциативных нейронов, а при длительном низкоинтенсивном световом воздействии значительно опережает дегенерацию нейронов. Усиление пролиферативной активности сохранившихся глиоцитов пропорционально росту глионейрональной деструкции и характеризуется разрастанием глиальных отростков с последующим замещением деструктивных клеточных элементов в очагах поражения, что является отражением адаптационных механизмов.

6. Световое воздействие и освещение на фоне аллоксанового диабета вызывает повреждение компонентов гематоретинального барьера и гемодинамические нарушения. Наиболее чувствителен к данным воздействиям наружный отдел ГРБ, где очаговая деструкция пигментного эпителия и эндотелия хориокапилляров приводит к тромбообразованию 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.

7. Препараты асковертин и каровертин оказывают ретинопротекторное действие, более выраженное при высокоинтенсивном световом воздействии и реализующееся через защиту высокомолекулярных структур от окисления и улучшение микроциркуляции. По влиянию на синаптический аппарат сетчатки наибольшей эффективностью обладает каровертин.

8. Предложенная математическая модель является универсальной для изучения повреждения и репарации сетчатки при световом и сочетанном с диабетом освещении в любой момент времени на протяжении эксперимента, а также дает возможность прогнозировать эти изменения по временному показателю.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Закономерности и тканевые механизмы пострадиационных изменений зрительного анализатора при многофакторных воздействиях / С. В. Логвинов, И. С. Малиновская, А. В. Потапов, Е. Ю. Варакута и др. // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической морфологии: Материалы конференции, посвященной 150-летию со дня рождения А.С. Догеля / Сибирский гос. мед. ун-т. - Томск, 2002. - Вып. 2. - С.46-47.
2. Изменение структур глаза при световом воздействии / А. В. Потапов, Е. Ю. Варакута, Д. А. Дробатулина и др. // Морфология. - 2002. - № 2-3. - С. 128.
3. Строение сетчатки и циркадианных пейсмекеров мозга при световых и комбинированных воздействиях / С. В. Логвинов, А. В. Потапов, А. В. Герасимов, Е. Ю. Варакута, Д. А. Дробатулина // Морфология. - 2002. - № 2-3. - С. 94.
4. Динамика структурных изменений сетчатки при длительном воздействии яркого света / С. В. Логвинов, А. В. Потапов, Е. Ю. Варакута, Д. А. Дробатулина // Бюл. эксп. биологии и медицины. - 2003. - № 10. - С. 463-466.

5. Морфологические изменения нейросенсорных клеток сетчатки при низкоинтенсивном световом воздействии / Е. Ю. Варакута, Е. П. Михуля, А. А. Жданкина и др. // Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии / Сибирский гос. мед. ун-т. - Томск, 2004. - Т. 3. - № 4. - С. 6.
6. Поражения сетчатки глаза при низкоинтенсивном световом воздействии / Е. Ю. Варакута, Е. П. Михуля, А. В. Потапов и др. // Морфология. - 2004. - № 4. - С. 27.
7. Структурные изменения сетчатки при комбинированном воздействии ионизирующей радиации и яркого света / С. В. Логвинов, А. В. Потапов, Е. Ю. Варакута и др. // Морфология. - 2004. - № 4. - С. 69.
8. Эффекты комбинированного воздействия ионизирующей радиации и света на сетчатку глаза / С. В. Логвинов, А. В. Потапов, Е. Ю. Варакута и др. // Радиационная биология, радиоэкология. - 2004. - Т. 44. - № 6. - С. 661-667.
9. Влияние асковертина на морфологические изменения сетчатки крыс при воздействии высокоинтенсивного света / С. В. Логвинов, М. Б. Плотников, Е. Ю. Варакута и др. // Бюл. эксп. биологии и медицины. - 2005. - № 11. - С. 591-594.
10. Изменения сетчатки и зрительного нерва при комбинированном воздействии ионизирующей радиации и высокоинтенсивного света / Е. Ю. Аникина, А. В. Потапов, Е. Ю. Варакута и др. // Вятский медицинский вестник Кировской медицинской академии. - Киров, 2005. - С. 56.
11. Логвинов, С. В. Поражение клеток нейральной сетчатки и ретинального пигментного эпителия глаз крыс при воздействии высокоинтенсивного света на фоне аллоксанового диабета / С. В. Логвинов, Е. Ю. Варакута, А. В. Потапов // Радиационная биология, радиоэкология. - 2005. - № 6. - С. 732-736.
12. Структурные изменения сетчатки и стекловидного тела при моделировании пролиферативной витреоретинопатии на фоне аллоксанового диабета / С. В. Логвинов, О. И. Кривошеина, И. В. Запускалов, Е. Ю. Варакута, А. В. Потапов // Морфология. - 2005. - Т. 127. - № 3. - С. 34-37.
13. Структурные изменения пигментного эпителия и нейросенсорных клеток сетчатки глаза при воздействии высоко- и низкоинтенсивного света / С. В. Логвинов, Е. Ю. Варакута, А. А. Жданкина и др. // Материалы V съезда по радиационным исследованиям / Москва, 2006. - Т. 3. - С. 115.
14. Влияние асковертина на структурные изменения ганглионарных нейронов сетчатки глаз крыс при фотоповреждении на фоне аллоксанового диабета / Е. Ю. Варакута, А. А. Жданкина, А. В. Потапов и др. // Морфология. - 2006. - Т. 129. - № 4. - С. 29 - 30.
15. Влияние каровертина на морфофункциональное состояние пигментного эпителия при воздействии яркого света на фоне аллоксанового диабета / Е. Ю. Варакута, С. В. Логвинов, М. Б. Плотников и др. // Морфология. - 2006. - Т. 130. - № 5. - С. 31 - 32.
16. Влияние асковертина на изменения синаптоархитектоники сетчатки крыс с аллоксановым диабетом при высокоинтенсивном световом воздействии / С.

- В. Логвинов, М. Б. Плотников, Е. Ю. Варакута и др. // Морфология. - 2006. – Т. 130. - № 5. – С. 59.
17. Изменения синапсов сетчатки при комбинированном воздействии ионизирующей радиации и постоянного низкоинтенсивного света / А. В. Потапов, С. В. Логвинов, Е. Ю. Варакута и др. // Морфология. - 2006. – Т. 130. - № 5. – С. 72.
 18. Изменения сетчатки и зрительного нерва при комбинированном воздействии ионизирующей радиации и света / С. В. Логвинов, А. В. Потапов, Е. Ю. Варакута и др. // Морфология. - 2006. – Т. 129. - № 4. – С. 76.
 19. Морфологические изменения клеточных элементов сетчатки глаза при длительном низкоинтенсивном световом воздействии / С. В. Логвинов, Е. Ю. Варакута, А. В. Потапов и др. // Бюл. сибирской медицины. - 2006. - № 3. - С. 31-36.
 20. Морфологические изменения пигментного эпителия и нейросенсорных клеток сетчатки крыс с аллоксановым диабетом при ярком освещении и их коррекция каровертином / С. В. Логвинов, М. Б. Плотников, Е. Ю. Варакута и др. // Структурно-функциональные и нейрохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга: Материалы Всероссийской конференции с международным участием / ИЗПЦ «Информкнига» – Москва, 2006. - С. 165-168.
 21. Реакция радиальных глиоцитов крыс при фотоповреждении на фоне коррекции асковертином как показатель репарационных механизмов сетчатки / С. В. Логвинов, А. А. Жданкина, Е. Ю. Варакута и др. // Актуальные проблемы учения о тканях / Санкт-Петербург, 2006. - С. 58-59.
 22. Реакция гематоретинального барьера на длительное фотоповреждение / С. В. Логвинов, А. В. Потапов, Е. Ю. Варакута и др. // Структурно-функциональные и нейрохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга: Материалы Всероссийской конференции с международным участием / ИЗПЦ «Информкнига» – Москва, 2006. - С. 252-255.
 23. Реакция гематоретинального барьера на комбинированное воздействие ионизирующей радиации и яркого света / А. В. Потапов, Е. Ю. Варакута, С. В. Логвинов и др. // Бюл. сибирской медицины. - 2007. - № 2. - С. 42-46. (принята в печать 22.11.2006).
 24. Ретинопротекторные эффекты асковертина при световом воздействии в условиях гипергликемии / С. В. Логвинов, М. Б. Плотников, Е. Ю. Варакута и др. // Бюл. сибирской медицины. - 2007. - № 1. - С. 39-44. (принята в печать 20.11.2006).
 25. Морфологические изменения ассоциативных нейронов сетчатки при фотоповреждении на фоне аллоксанового диабета и их коррекция асковертином / Е. Ю. Варакута, А. А. Жданкина, А. В. Потапов и др. // Материалы VII Международной научно-практической конференции "Здоровье и образование в XXI веке" - Москва, 2007. - С. 99.
 26. Влияние каровертина на реакцию пигментного эпителия и радиальной глии сетчатки при воздействии яркого света / С. В. Логвинов, М. Б. Плотников, Е.

- Ю. Варакута и др. // Бюл. эксп. биологии и медицины. - 2007. - Т. 144. - № 7. - С. 112-114.
27. Структурные изменения компонентов гематоретинального барьера сетчатки крыс при фотоповреждении на фоне аллоксанового диабета и их коррекция асковертином / С. В. Логвинов, М. Б. Плотников, Е. Ю. Варакута, А. А. Жданкина // Бюл. эксп. биологии и медицины. - 2007. - № 12. - С. 703-706.
28. Ультраструктурные изменения синапсов сетчатки крыс с аллоксановым диабетом при длительном низкоинтенсивном освещении, коррекция каровертином / С. В. Логвинов, Е. Ю. Варакута, А. А. Жданкина и др. // Структурно-функциональные, нейрохимические и иммунохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга: Материалы Всероссийской конференции с международным участием / Изд-во ИКАР. – Москва, 2007. - С. 364-368.
29. Изменения синаптоархитектоники сетчатки при фотоповреждении и их коррекция антиоксидантами растительного происхождения / С. В. Логвинов, Е. Ю. Варакута, А. А. Жданкина, А. В. Потапов // Морфология. - 2008 - Т. 133 - № 1. - С. 48-50.
30. Варакута, Е. Ю. Структурные изменения радиальной глии сетчатки при фотоповреждении, коррекция биофлавоноидами / Е. Ю. Варакута // Университетская наука: теория, практика, инновации: Материалы 73-й итоговой научной сессии сотрудников КГМУ / Изд-во КГМУ. - Курск, 2008. - Т. 2. - С. 318-321.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АЗК - активная зона контакта
ВЯС - внутренний ядерный слой
ЭПС - эндоплазматическая сеть
лк - люкс
НСК - нейросенсорная клетка
НЯС - наружный ядерный слой
ПОЛ - перекисное окисление липидов
ПЭ - пигментный эпителий
сут - сутки
ФВК - фосфорно-вольфрамовая кислота