

Н.А.Ульянова¹
Н.Е.Думброва²
Н.И.Молчанюк²

¹ Одесский национальный
медицинский университет

² НИИ глазных болезней и
тканевой терапии имени
В.П.Филатова
г. Одесса

Ключевые слова: склера,
миопия, электронная мик-
роскопия.

Надійшла: 12.11.2013

Прийнята: 23.12.2013

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2013.4.67-72>

УДК 611.841.3

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ СКЛЕРЫ ИНТАКТНЫХ КРЫС

Исследование проведено в рамках научно-исследовательской работы «Вдосконалення технологій хірургічного та медикаментозного лікування найбільш поширених захворювань ока, що призводять до стійкого зниження зору (катаракта, кератит, дистрофія сітківки, травми органа зору)» (номер державної реєстрації 0108U010380).

Реферат. Цель – изучить возрастные особенности склеры у интактных крыс на ультраструктурном уровне. У интактных крыс в возрасте 14, 21, 30, 90 дней исследовали ультраструктуру склеры с помощью электронной микроскопии. При перестройке склеры в период с 14 по 90 день постнатального онтогенеза наблюдается уменьшение количества фибробластов, снижение их функциональной активности, упорядочение коллагеновых волокон. Наибольшая интенсивность перестройки склеры наблюдается в период 14-30 дней постнатального онтогенеза, этот период является оптимальным для моделирования миопии.

Morphologia. – 2013. – Т. 7, № 4. – С. 67-72.

© Н.А.Ульянова, Н.Е.Думброва, Н.И.Молчанюк, 2013

✉ ulvad@ukr.net

Ulyanova N.A., Dumbrova N.E., Molchanyuk N.I. Age ultrastructural features of sclera in intact rats.

ABSTRACT. Background. The absence of adequate experimental myopia model is the actual problem in pathophysiological studying of the myopia progression. Studies of the chick eye have formed the basis for several hypotheses of myopic development. The most pathogenesis reasonable myopia animal model is a form-deprivation myopia in chicks. The introduction of form-deprivation myopia animal model in mammals in particular rats, is necessary to study the dynamics of age morphological changes in sclera. **Objective.** To examine age-related features of the sclera in intact rats on the ultra-structural level. **Methods.** It was investigated the sclera ultrastructure by using electron microscopy method in intact rats at 14, 21, 30, 90 days. **Results.** It was set that in rats' eyes at the age of 14-21 days the sclera presence of fibroblasts, characterizing the active generation of plastic materials, mainly on collagen. At the age of 30-90 days, the number of fibroblasts decreases and normal cells become mature look. However, practically, in all study periods, but with advantage aged 14-21 days, some of the cells are eliminated by apoptosis. At the age of 14-21 days is not formed clear scleral tissue architecture, part of the collagen fibrils stacked in bundles, part loosely arranged. At the age of 90 days, collagen scleral stroma is ordered. **Conclusion.** We identified a significant amount of fibroblasts decreasing, fibroblasts functional activity reduction, and collagen fibers ordering in sclera of the intact rats during the period from 14 to 90 days of postnatal ontogenesis. The highest intensity of the restructuring in the sclera is observed between 14-30 days of postnatal ontogenesis. In our opinion, this period is optimal for experimental modeling myopia in rats.

Key words: sclera, myopia, electron microscopy

Citation:

Ulyanova NA, Dumbrova NE, Molchanyuk NI. [Age ultrastructural features of sclera in intact rats]. *Morphologia.* 2013;7(4):67-72. Russian.

Введение

В настоящее время отмечается неуклонный рост заболеваемости миопией [1; 2; 3]. Миопизация, начинаясь как физиологический процесс рефрактогенеза глаза в детстве, постепенно трансформируется в аномалию рефракции [4; 5]. Причем, в ряде случаев данный процесс сопряжен с бесконтрольным увеличением переднезаднего размера глаза, что влечет за собой структурные изменения всех оболочек глазного яблока [6].

Одна из основных сложностей изучения патогенеза прогрессирования миопии обусловлена отсутствием адекватной экспериментальной модели данного заболевания [7]. Наиболее патогенетически обоснованной является депривационная модель миопии, воспроизводимая на цыплятах [8]. На наш взгляд, актуальным является внедрение в экспериментальную практику данной модели на млекопитающих в частности крысах, которым свойственны периоды интенсивного роста, что позволит адаптировать сроки модели-

рования к периодам интенсивного увеличения переднезаднего размера глаза. Начальным этапом разработки экспериментальной модели любого патологического процесса является изучение особенностей строения тканей и органов интактных животных в различные временные периоды онтогенеза.

Цель

Изучить возрастные особенности склеры у интактных крыс на ультраструктурном уровне.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования проведены на 12 интактных крысах линии Вистар содержащихся в стандартных условиях экспериментально-биологической клиники Одесского национального медицинского университета. Все экспериментальные исследования проведены с соблюдением принципов биоэтики, изложенных в Хельсинской декларации и Законе Украины «О защите животных от жестокого отношения» (№ 1759-VI от 15.12.2009) и учетом рекомендаций В.Д. Мишалова и соавторов [9] относительно проведения научных морфологических исследований. Возраст животных 14, 21, 30 и 90 дней после рождения, по достижении соответствующего возраста животные выводились из эксперимента путем дислокации шейных позвонков под эфирным наркозом, после чего фрагменты глазного яблока забирались для ультраструктурных исследований.

Для электронно-микроскопического исследования кусочки ткани склеры фиксировались в 2,5% растворе глутаральдегида на фосфатном буфере при значении pH 7,4 с последующей дофиксацией 1 % раствором осмиевой кислоты при том же pH буферного раствора. Затем образцы обезживались в спиртах восходящей крепости. Пропитывание материала и его заключение производилось в смеси эпон-аралдит. Затем ультратонкие срезы контрастировались по методике Reynolds. Просматривались и фотографировались срезы в электронном микроскопе ПЭМ-100-01. Ультраструктурные исследования проведены в группе электронной микроскопии лаборатории патоморфологии и электронной микроскопии НИИ глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова под руководством профессора Н.Е. Думбровой.

Результаты и их обсуждение

При электронно-микроскопическом исследовании показано, что у 14-и дневных животных архитектура ткани склеры, в целом, не полностью упорядочена. Пучки коллагеновых фибрилл рыхлые, местами разнонаправленные, сами фибриллы зрелые, содержат типичную исчерченность. Толщина фибрилл заметно колеблется: от очень тонких до сравнительно более толстых и расположенных компактно (рис.1). Ткань склеры богата клетками. Фибробласты здесь в виде крупных отросчатых клеток с крупным ядром и

обильной цитоплазмой, заполняющей и отростки. Ядро содержит глыбки хроматина с электронно-плотным маргинальным слоем. В цитоплазме преобладают органеллы, участвующие в синтезе белка: рибосомы, полисомы, разветвленные каналцы гранулярной эндоплазматической сети, а также митохондрии, везикулы. Снаружи у плазмалеммы клеток местами встречаются скопления очень тонких фибрилл – протофибрилл коллагена (рис. 2). На отдельных участках склеральной ткани преобладают волокнистые структуры, среди которых сравнительно немного клеток с признаками различной степени деструкции внутриклеточных элементов или распада отростков или клетки в целом (рис. 3). Частично измененные клетки содержат сморщенное осмиофильное ядро и цитоплазму с деструкцией органелл и наличием лизосом. Клетки с разрушенной ультраструктурой представляют электронно-прозрачные полости, содержащие элементы клеточного детрита.



Рис. 1. Склера крысы в возрасте 14 дней. Трансмиссионная электронная микроскопия. $\times 8000$.

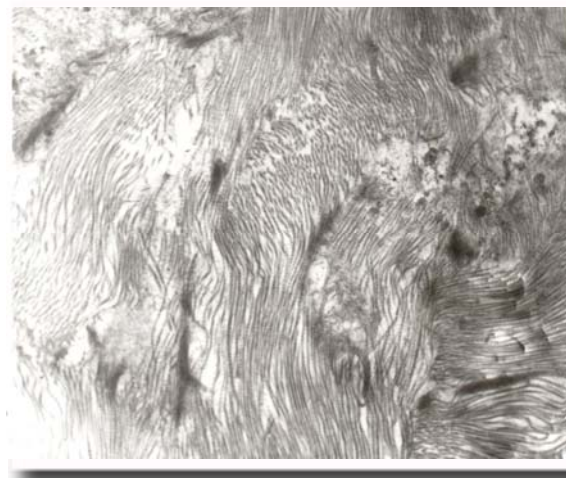


Рис. 2. Склера крысы в возрасте 14 дней. Функционально активный фибробласт, протофибриллы у плазмалеммы клетки. Трансмиссионная электронная микроскопия. $\times 4000$.

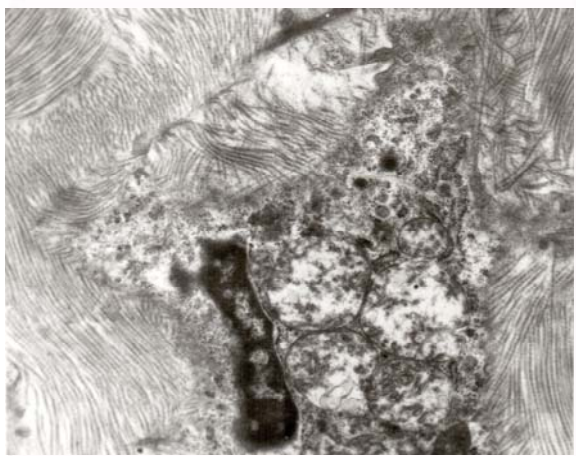


Рис. 3. Склера крысы в возрасте 14 дней. Разрушающийся фибробласт с остатками ядра и цитоплазмы. Трансмиссионная электронная микроскопия. $\times 5000$.

При электронно-микроскопическом исследовании животных в возрасте 21 день показано, что фибробласты склеры несколько более уплощённые с длинными и тонкими отростками. Ядра клеток крупные, часть из них уплощена, цитоплазма в клетках богата элементами, участвующими в белковом синтезе, однако часть фибробластов содержат более типичный для зрелых клеток набор органелл. Расположение пучков коллагеновых фибрилл более упорядоченное, по сравнению с предыдущим сроком наблюдения (рис. 4). Часть материала склеры содержит фибробласты с ядрами повышенной электронной плотности, часто фрагментированными и просветленную с узким ободком цитоплазму, почти без органелл. Часть фибробластов теряют цитоплазматические структуры, становятся электронно-прозрачными, часть клеток разрушаются путём распада на крупные фрагменты по типу апоптоза (рис. 5).



Рис. 4. Склера крысы в возрасте 21 день. Фибробласт, окруженный пучками коллагеновых фибрилл. Трансмиссионная электронная микроскопия. $\times 6000$.



Рис. 5. Склера крысы в возрасте 21 день. Фрагменты ядер и цитоплазмы фибробласта в состоянии деградации. $\times 5000$.

При ультраструктурном исследовании склеры животных в возрасте 30 дней показано, что пластины из пучков коллагеновых фибрилл практически сформированы. Клетки значительно уплощены и имеют длинные истончённые отростки, содержащие обычный набор органелл нормальных фибробластов (рис. 6). Вместе с тем в ткани встречаются активные фибробласты. В склере присутствуют фрагментированные разрушающиеся фибробласты, а также фибробласты утратившие структуры и представляющие собой клетки-тени (рис. 7).



Рис. 6. Склера интактной крысы в возрасте 30 дней. Ультраструктура отростка фибробласта. Архитектоника коллагеновых фибрилл. $\times 12000$.

Ультраструктурные исследования животных в возрасте 90 дней показали, что коллагеновые структуры склеры организованы в плотные пучки, располагающиеся в различных направлениях. Между пучками коллагеновых фибрилл располагаются клетки, имеющие обычную структуру зрелых фибробластов. На отдельных участках

встречаются крупные фибробласты с цитоплазмой, богатой элементами, участвующими в белковом синтезе (рис. 8, 9). Среди сформированных пучков коллагеновых фибрилл встречаются также и отростки фибробластов в активном состоянии. Кроме того, наблюдаются единичные клетки в состоянии фрагментации и распада (рис. 10).

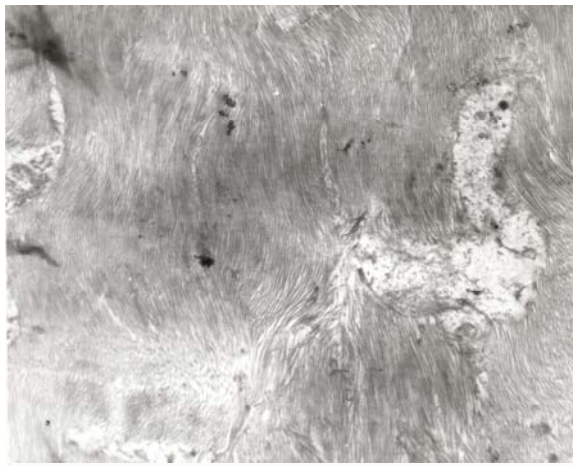


Рис. 7. Склера интактной крысы в возрасте 30 дней. Электронно-прозрачные фрагменты фибробластов («тени фибробластов»), окружённые пучками коллагеновых фибрилл. $\times 5000$.

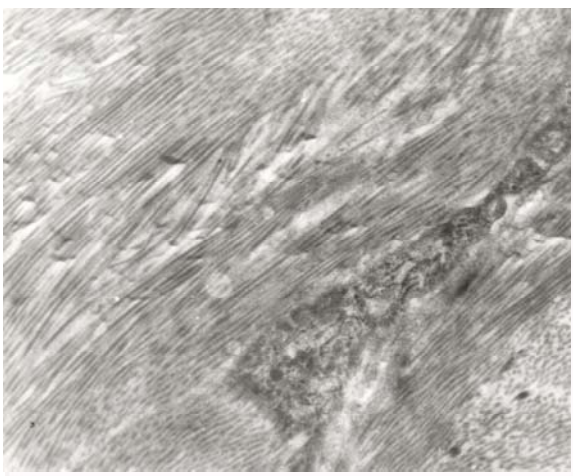


Рис. 8. Склера интактной крысы в возрасте 90 дней. Ультраструктура отростка фибробласта. Архитектоника коллагеновых фибрилл. $\times 10000$.

Таким образом, в возрастной динамике развития ткани склеры у крыс отмечается на ранних сроках (14-21 день) наличие фибробластов, находящихся в активном состоянии, т. е. характеризующихся активной выработкой пластических материалов (в основном, продуцирования коллагена). В более поздние сроки (30-90 дней) количество таких фибробластов уменьшается, и клетки приобретают обычный зрелый вид. Вместе с тем, практически, во все сроки исследования, но

с преобладанием в начальные сроки (14-21 день), часть клеток подвергаются деструкции, в основном, по типу апоптоза. Формирование волокнистой части склеры также меняется по ходу возрастной динамики: в начальные сроки, особенно (14-21 день), не сформирована чёткая архитектура ткани, коллагеновые фибриллы частью уложены в пучки, частью расположены рыхло и лежат хаотично. К 30-ти суткам наблюдается более чёткая организация волокнистой части склеры. К сроку 90 дней коллагеновая строма склеры упорядочена, пучки коллагеновых фибрилл крупные и располагаются в виде пластин, идущих в различных направлениях.

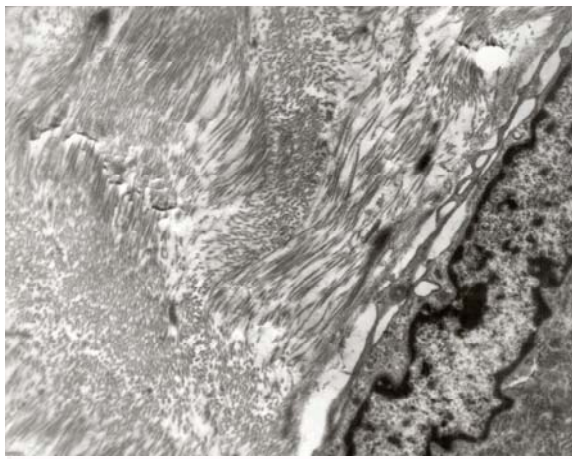


Рис. 9. Склера интактной крысы в возрасте 90 дней. Ультраструктура пучков коллагеновых фибрилл, фрагмент фибробласта с высокой функциональной активностью. $\times 5000$.

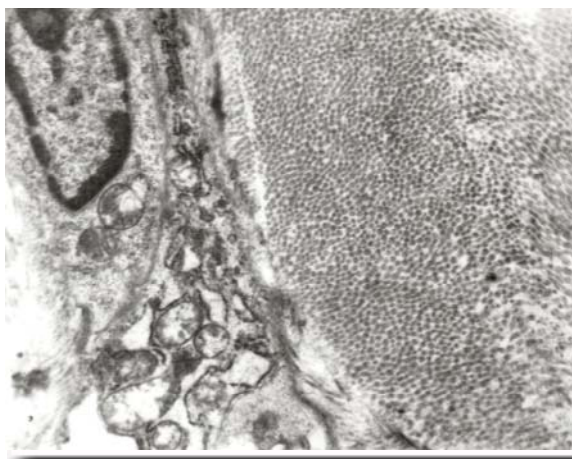


Рис. 10. Склера интактной крысы в возрасте 90 дней. Ультраструктура пучков коллагеновых фибрилл в поперечном сечении и элементы распада фибробласта. $\times 10000$.

Б.Л. Радзиховский [10] в своих работах подчеркивал, что в основе ослабления склеры и развития миопии лежит нарушение трофики оболочек глаза под воздействием неблагоприятных факторов, и с патогенетической точки зрения все

формы миопии однородны, различия обусловлены только интенсивностью и длительностью воздействия неблагоприятного фактора [10].

Данная гипотеза о значении склерального фактора в патогенезе миопии получила дальнейшее развитие и экспериментальное подтверждение в комплексных исследованиях биомеханических, морфологических и биохимических свойств склеры миопических глаз. Обсуждалась роль слабости склеры у лиц с миопией как одного из проявлений ослабления опорной функции соединительной ткани. Такие биомеханические свойства склеры как прочность и упругость определяются, во-первых, концентрацией коллагена, плотностью упаковки коллагеновых волокон и их архитектоникой, во-вторых, составом и пространственной структурой протеогликановых комплексов и способом их взаимосвязи с волокнами, в-третьих, наличием в этих биополимерах стабилизирующих внутри и межмолекулярных связей [11]. Патологические представления о взаимосвязи патологии соединительной ткани и прогрессировании миопии, высказанные академиком В.П. Филатовым, позже были детально изучены и систематизированы в последующих

работах, при этом было доказано, что в процессе прогрессирования миопии происходит дезорганизация соединительной ткани склеры на фоне обменных нарушений в организме [12].

Сопоставление вышеперечисленных морфологических предпосылок возникновения и прогрессирования миопии с особенностями перестройки склеры в постнатальном онтогенезе, позволяет предположить, что наиболее оптимальный период воспроизведения экспериментальной миопии – 14-30-тидневный возраст лабораторных животных.

Заключение

При перестройке склеры интактных крыс в период с 14 по 90 день постнатального онтогенеза наблюдается уменьшение количества фибробластов, снижение их функциональной активности, упорядочение коллагеновых волокон. Наибольшая интенсивность перестройки склеры наблюдается в период 14-30 дней постнатального онтогенеза, этот период является оптимальным для моделирования миопии.

Перспективы дальнейших разработок – исследовать ультраструктурные изменения склеры при моделировании миопии.

Литературные источники References

1. Myrowitz E. H. Juvenile myopia progression, risk factors and interventions / E. H. Myrowitz // Saudi. J. Ophthalmol. – 2013. – Vol. 26, № 3. – P. 293-297.

Myrowitz EH. Juvenile myopia progression, risk factors and interventions. Saudi. J. Ophthalmol. 2013;26(3):293-7.

2. Смирнова И. Ю. Современное состояние зрения школьников: проблемы и перспективы / И. Ю. Смирнова, А. С. Ларшин // Глаз. – 2011. – № 3. – P. 2-8.

Smirnova IY, Larshin AS. [The current state of schoolchildren vision: problems and prospects]. Glaz. 2011;3:2-8. Russian.

3. Increase in myopia prevalence in clinic-based populations across a century / P. K. Hrynchak, A. Mittelstaedt, C. M. Machan [et al.] // Optom. Vis. Sci. – 2013. – Vol. 90, № 11. – P. 1331-1341.

Hrynchak PK, Mittelstaedt A, Machan CM, Bunn C, Irving EL. Increase in myopia prevalence in clinic-based populations across a century. Optom Vis Sci. 2013;90(11):1331-41. doi: 10.1097/OPX.000000000000069.

4. Бушуева Н. Н. Современные аспекты этиологии, патогенеза и хирургического лечения прогрессирующей миопии / Н. Н. Бушуева // Офтальмологический журнал. – 2006. – № 3. – С. 65-70.

Bushuyeva NN. [Modern aspects of the etiology, pathogenesis and surgical treatment of progressive myopia]. Ophthalmologicheskii zhurnal. 2006;3:65-70. Russian.

5. Ланцевич А. В. Современные аспекты этиологии приобретенной близорукости // А. В.

Ланцевич // Глаз. – 2007. – № 4. – С. 36-38.

Lancevich AV. [Modern aspects of acquired myopia etiology]. Glaz. 2007;4:36-8. Russian.

6. Акустическая плотность склеры как фактор прогноза развития периферических витреохориоретинальных дистрофий при миопии: результаты 10-летнего динамического наблюдения / Е. П. Тарутта, М. В. Максимова, Г. В. Кружкова [и др.] // Вестник офтальмологии. – 2013. – № 1. – С. 16-21.

Taroutta EP, Maximova MV, Krouzhkova GV, Khodjabekyan NV, Markosyan GA. [Acoustic density of sclera as prognostic factor of peripheral vitreochorioretinal degenerations in myopia: results of a 10-years follow-up]. Vestnik oftalmologii. 2013;1:16-21. Russian.

7. Myopia: animal models to clinical trials / R. W. Beuerman, S. M. Saw, D. T. Tan, T. Y. Wong. – Singapore : World Scientific, 2010. – 390 p.

Beuerman RW, Saw SM, Tan DT, Wong TY. Myopia: animal models to clinical trials: Singapore: World Scientific; 2010. 390 p.

8. Mathis U. Transforming growth factor-beta in the chicken fundal layers: an immunohistochemical study / U. Mathis, F. Schaeffel // Exp. Eye Res. – 2010. – Vol. 90, № 6. – P. 780-790.

Mathis U, Schaeffel F. Transforming growth factor-beta in the chicken fundal layers: an immunohistochemical study. Exp. Eye Res. 2010;90(6):780-90.

9. Мішалов В. Д. Про правові, законодавчі та етичні норми і вимоги при виконанні наукових досліджень / В. Д. Мішалов, Ю. Б. Чайковський, І. В. Твердохліб // Морфологія. – 2007 – Т. 1, № 2. – С. 108-115.

Mishalov VD, Chaikovskiy YuB, TverdokhleB IV. [About legal, legislative, ethical standards and requirements at performance scientific researches]. *Morphologia*. 2007;1(2):108-15. Russian.

10. Радзиховский Б. Л. Близорукость / Борис Леонидович Радзиховский. – М. : Медгиз, 1963. – 196 с.

Radzihovskiy BL. [Myopia]. Moscow: Medgiz; 1963. 196 p. Russian.

11. Аветисов Э. С. Близорукость / Эдуард Сергеевич Аветисов. – М. : Медицина, 2002. – 288 с.

Avetisov ES. [Myopia]. Moscow: Medicine; 2002. 288 p. Russian.

12. Бушуева Н. Н. Активность трипсиноподобных протеаз и антипротеолитическая активность в сыворотке крови и слезной жидкости у детей и подростков с прогрессирующей близорукостью / Н. Н. Бушуева, С. Г. Коломийчук, Абу-Афифе Шариф // *Офтальмологический журнал*. – 2002. – № 4. – С. 31–34.

Bushuyeva NN, Kolomiychuk SG, Abu-Afife Sharif [Activity of trypsin-like proteases and antiproteolytic activity in serum and tear in children and adolescents with progressive myopia]. *Oftalmologicheskij zhurnal*. 2002;4:31-4. Ukrainian.

Ульянова Н.А., Думброва Н.Є., Молчанюк Н.І. Вікові особливості ультраструктури склери інтактних щурів.

Реферат. Мета – дослідити вікові особливості склери у інтактних щурів на ультраструктурному рівні. У інтактних щурів віком 14, 21, 30, 90 діб дослідили ультраструктуру склери за допомогою електронної мікроскопії. При перебудові склери в період з 14 по 90 добу постнатального онтогенезу спостерігалося зменшення кількості фіброblastів, зниження їх функціональної активності, упорядкування колагенових волокон. Найбільша інтенсивність перебудови склери спостерігається в період 14-30 діб постнатального онтогенезу, цей період є оптимальним для моделювання міопії.

Ключові слова: склера, міопія, електронна мікроскопія.