

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, Одесса

Ключевые слова: склера, миопия, гистоструктура, ультраструктура.

Надійшла: 24.05.2014

Прийнята: 12.06.2014

УДК 611.841.3

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СКЛЕРЫ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ МИОПИИ

Исследование проведено в рамках научно-исследовательской работы «Усовершенствование технологий хирургического и медикаментозного лечения наиболее распространенных заболеваний глаза, приводящих к стойкому снижению зрения (катаракта, кератит, дистрофия сетчатки, травмы органа зрения)» (номер государственной регистрации 0108U010380).

Реферат. Цель: исследовать изменения линейных размеров глазного яблока и морфологические особенности склеры при моделировании депривационной миопии у крыс. У крыс в возрасте 14 дней моделировали депривационную миопию путем блефарорафии. Исследовали линейные размеры глазного яблока и морфологические свойства склеры на 7-е и 14-е сутки эксперимента. Свойства склеры исследовали на светооптическом и электронномикроскопическом уровне. Депривация зрения у крыс приводит к увеличению темпа роста линейных размеров глазного яблока, в большей степени сагитального, по сравнению с интактными животными ($p < 0,05$), что свидетельствует о развитии осевой миопии. В склере экваториальной области миопического глазного яблока выявлены минимальные изменения в виде отека коллагеновых фибрилл. В склере заднего полюса глазного яблока выявлены нарушения архитектоники и структуры коллагеновых фибрилл, дегенеративные и деструктивные изменения фибробластов, деформация склерального кольца, что может быть признаком развивающейся миопической стафиломы склеры.

Morphologia. – 2014. – Т. 8, № 2. – С. 72-76.

© Н.А.Ульянова, Н.Е.Думброва, Н.И.Молчанюк, 2014

✉ ulyanova@ukr.net

Ulyanova N.A., Dumbrova N.E., Molchanyuk N.I. Morphological changes of sclera in rats with experimental myopia.

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. It is necessary to study the dynamics of morphological changes in sclera in rats with form-deprivation myopia. **Purpose.** To investigate changes in the linear dimensions of eyeball and the morphological features of sclera in form-deprivation myopia in rats. **Methods.** In rats aged 14 days simulated form-deprivation myopia by blepharorrhaphy. The linear dimensions of the eyeball and morphological properties of sclera were studied on the 7th and 14th day of the experiment. Properties of sclera has been studied on the light and electron microscopic level. **Results.** The studies revealed increasing of sagittal, horizontal and vertical sizes of eyeball in rats with form-deprivation myopia. Sagittal size of the eye in intact rats aged 30 days was on average 4,84±0,08 mm, at the age of 90 days 5,14±0,01 mm. On the 14-th day of modeling myopia (age rats 30 days) sagittal size of the eye averaged 5,18±0,06 mm. The collagen fibrils architectonics changes in sclera were revealed mainly in the posterior pole of eyeball. Architectonics broken collagen fibers observed fragmentation, swelling, reduced cell number. Revealed deformation of the scleral ring in the optic disc. **Conclusion.** Vision deprivation in rats leads to increased growth rate of the linear dimensions of eyeball, more sagittal compared to intact animals ($p < 0,05$), suggesting the development of axial myopia. Minimal changes of sclera collagen fibrils such as swelling were set in the equatorial region of myopic eyeball. Disorders of architectonics and structure of collagen fibrils, degenerative and destructive changes in fibroblasts, deformation of the scleral ring were revealed in the posterior pole of eye, which may be a sign of developing myopic scleral staphyloma.

Key words: sclera, myopia, histological structure, ultrastructure.

Citation:

Ulyanova NA, Dumbrova NE, Molchanyuk NI. [Morphological changes of sclera in rats with experimental myopia]. Morphologia. 2014;8(2):72-6. Russian.

Введение

Одна из основных сложностей изучения патогенеза прогрессирования миопии обусловлена отсутствием адекватной экспериментальной мо-

дели данного заболевания [1]. Наиболее патогенетически обоснованной является депривационная модель миопии, воспроизводимая на цыплятах [2]. На наш взгляд, актуальным является вне-

дрение в экспериментальную практику данной модели на млекопитающих в частности крысах, которым свойственны периоды интенсивного роста глазного яблока [3]. Для оценки адекватности модели миопии необходимо исследование динамики изменения линейных размеров глазного яблока, морфофункциональных нарушений его оболочек при воспроизведении заболевания. Одним из ключевых механизмов развития миопии является перестройка склеры, в первую очередь коллагеновых фибрилл [4]. Однако данные о изменениях в строении склеры при моделировании миопии у крыс отсутствуют, что не позволяет сопоставить эти изменения с изменениями при прогрессировании миопии у человека, и, следовательно, оценить адекватность предложенной модели.

Цель: исследовать изменения линейных размеров глазного яблока и морфологические особенности склеры при моделировании депривационной миопии у крыс.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования проведены на 24 крысах линии Вистар содержащихся в стандартных условиях экспериментально-биологической клиники Одесского национального медицинского университета. Все экспериментальные исследования проведены с соблюдением принципов биоэтики, изложенных в Хельсинкской декларации и Законе Украины «О защите животных от жестокого отношения» (№ 1759-VI от 15.12.2009) и учетом рекомендаций Мишалова В.Д. и соавторов (2007) относительно проведения научных морфологических исследований [5].

У животных, по достижению возраста 14 дней, моделировали депривационную миопию, путем блефарорафии одного из глаз [6]. Через 14 дней после блефарорафии, животных выводили из эксперимента. Возраст животных на момент выведения из эксперимента составил 30 дней.

Измеряли сагитальный, горизонтальный и вертикальный размер глазного яблока электро-

механическим микрометром с точностью 0,02 мм. Для гистологических исследований глазное яблоко фиксировалось в 10 % нейтральном формалине, заливались в «Гистомикс» (Биовитрум, Россия), готовили постоянные гистологические препараты по общепринятой методике [7]. Срезы окрашивали гематоксилином-эозином, по ван Гизон. Исследовали методом световой микроскопии на микроскопе «Carl Zeiss Axiostar plus», оснащенной системой видеоанализа изображений „ВидеоТест-Мастер Морфология” (ООО „ВидеоТест”, Россия).

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 обезвоживались в спиртах восходящей крепости. Пропитывание материала и его заключение производилось в смеси эпон-аралдит. Затем ультратонкие срезы контрастировались по методике Reynolds [8]. 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.

Оценку достоверности отличий исследуемых показателей проводили с использованием дисперсионного анализа. В случае если нулевая гипотеза отвергалась для дальнейшего анализа использовали критерий Ньюмена-Кейлса [9].

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований выявлено, что при воспроизведении депривационной модели миопии у крыс отмечается увеличение всех определяемых размеров глаза. При этом, в большей степени увеличивается сагитальный размер (табл. 1).

Таблица 1

Изменения размеров глазного яблока при экспериментальной миопии (M±m, n=5, мм)

Группа животных	Размер глазного яблока		
	Сагитальный	Горизонтальный	Вертикальный
Интактные, возраст 30 дней	4,84±0,08	4,97±0,04	4,94±0,05
Интактные, возраст 90 дней	5,14±0,01*	5,29±0,02*	5,21±0,02*
Модель миопии, возраст 30 дней	5,18±0,06*	5,30±0,03*	5,28±0,05*

Примечание. * – p<0,05 по сравнению с интактными 30-тидневными животными.

В основе изменения линейных размеров глазного яблока лежат нарушения структуры склеры при моделировании миопии. На светоптическом уровне выявлены изменения архитектуры коллагеновых фибрилл, преимущественно

но в склере заднего полюса глазного яблока. Изменения проявлялись разрыхлением коллагеновых фибрилл, увеличением их толщины, уменьшением количества клеток, причем, вышеперечисленные нарушения наблюдали уже на 7-е су-

тки моделирования миопии (рис. 1). Обращает на себя внимание деформация склерального кольца в области диска зрительного нерва (рис. 2).

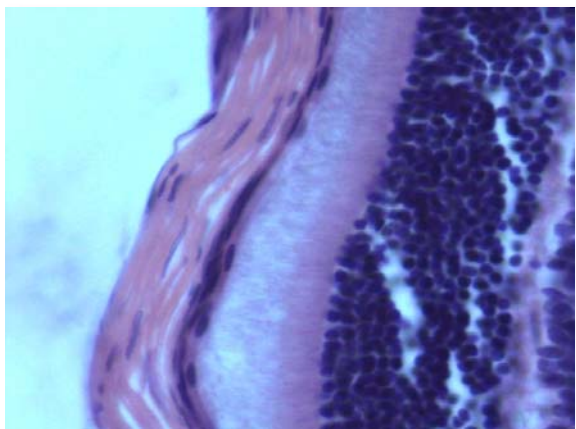


Рис. 1. Склера крысы, возраст 21 день. Моделирование депривационной миопии, 7-е сутки после блефарорафии. Нарушение архитектоники, отек коллагеновых фибрилл склеры. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$.

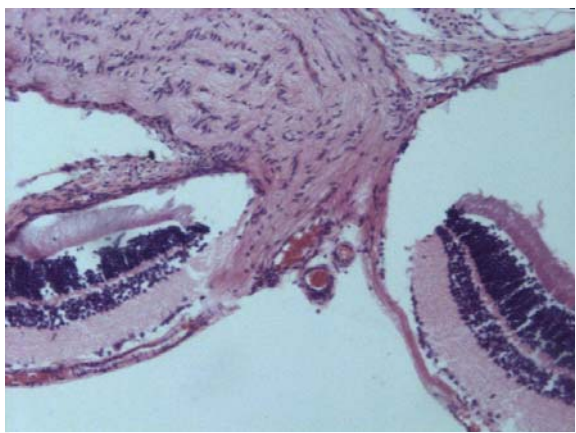


Рис. 2. Склера крысы, возраст 30 дней. Моделирование депривационной миопии, 14-е сутки после блефарорафии. Деформация склерального кольца в области диска зрительного нерва. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$.

Изменения, выявленные на светооптическом уровне, подтверждаются данными электронной микроскопии. Ткань склеры ближе к экваториальной области глазного яблока состоит из упорядоченных пучков продольно и поперечно расположенных коллагеновых фибрилл. Пучки коллагеновых фибрилл узкие, между ними большое количество фибробластов, находящихся в различном функциональном состоянии. Преимущественно фибробласты с типичной ультраструктурой, однако, встречаются, как функционально активные клетки с большим числом органелл, участвующих в белковом синтезе, так и клетки с признаками деструкции внутриклеточных орга-

нелл и единичные разрушающиеся клетки (рис. 3, 4). Фибриллы в пучках имеют неоднородную осмиофильность, местами рыхлые, но поперечная исчерченность чётко выражена (рис. 5). Выявленные изменения могут свидетельствовать о наличии отека склеры в этой области.

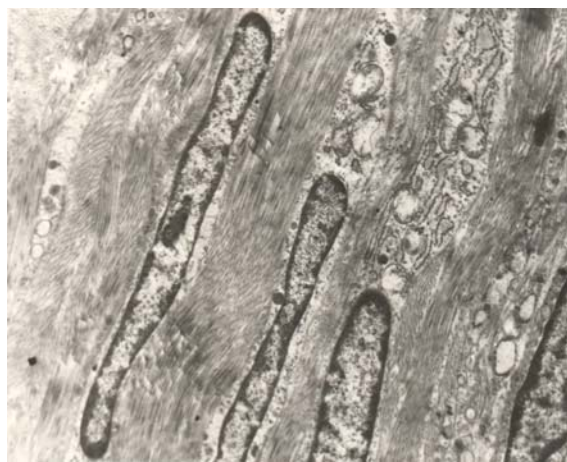


Рис. 3. Ультраструктура склеры 30-дневной крысы с 14-дневным моделированием миопии. Узкие пучки коллагеновых фибрилл, между которыми лежат фибробласты в большом количестве. Трансмиссионная электронная микроскопия. $\times 6000$.



Рис. 4. Ультраструктура склеры 30-дневной крысы с 14-дневным моделированием миопии. Фибробласты с частичной деструкцией внутриклеточных органелл. Трансмиссионная электронная микроскопия. $\times 12000$.

Таким образом, архитектура ткани склеры у экватора на 14-е сутки моделирования миопии, не отличается от нормальной структуры у крыс этого же возраста, за исключением отека коллагеновых фибрилл.

Архитектура ткани склеры у заднего полюса глаза нарушена (рис. 6, 7). Расстояние между пучками коллагеновых фибрилл увеличено, определяются электронно-прозрачные участки. Образовавшиеся полости могут свидетельство-

вать о наличии выраженного отёка. Коллагеновые фибриллы по своей ультраструктуре отличаются рыхлостью, а местами и сглаженностью поперечной исчерченности. Ткань склеры этого отдела содержит заметно меньше фибробластов. Значительная часть клеток отличается признаками внутриклеточной деструкции цитоплазматических органелл. Часть клеток разрушается, образуются электронно-прозрачные полости с обрывками биомембран или остатками ядер. Лишь единичные клетки содержат в себе элементы активации белоксинтезирующей системы.



Рис. 5. Ультраструктура склеры 30-дневной крысы с 14-дневным моделированием миопии. Пучок, отмечющийся неоднородностью, осмиофильностью коллагеновых фибрилл. Трансмиссионная электронная микроскопия. $\times 8000$.

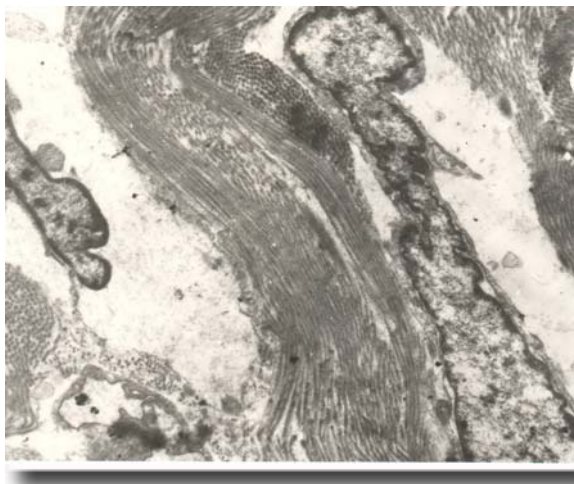


Рис. 6. Ультраструктура склеры 30-дневной крысы с 14-дневным моделированием миопии. Распад фибробластов и отёчные изменения между пучками коллагеновых фибрилл. Трансмиссионная электронная микроскопия. $\times 6000$.

Ранее были описаны возрастные особенности перестройки склеры и динамики роста ли-

нейных размеров глазного яблока интактных крыс, определен наиболее оптимальный период воспроизведения экспериментальной миопии [3, 10].

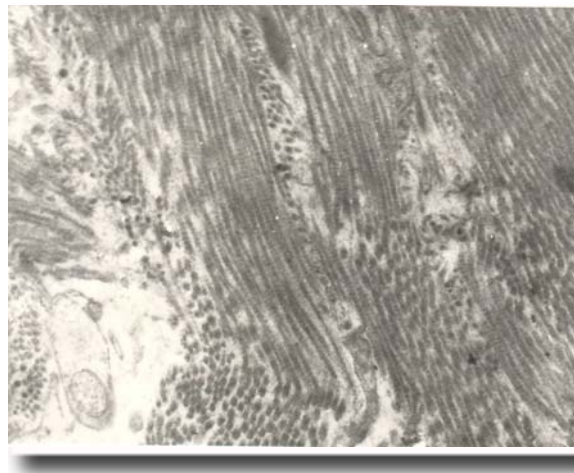


Рис. 7. Ультраструктура склеры 30-дневной крысы с 14-дневным моделированием миопии. Нарушения в структуре коллагеновых фибрилл склеры. Трансмиссионная электронная микроскопия. $\times 10000$.

Сопоставление морфологических предпосылок к возникновению миопии с особенностями перестройки склеры выявленными при моделировании заболевания подтверждают, что оптимальным периодом для воспроизведения близорукости являются 14-30-е сутки постнатального онтогенеза. Ранее выяснено, что склера эмметропического глаза обладает выраженной неоднородностью механических свойств. Несмотря на то, что склера в макулярной области имеет максимальную толщину, она более растяжима, чем склера экваториального пояса. В основе этих отличий лежат особенности плотности упаковки коллагеновых структур, их архитектура. Характерным для миопии является дезорганизация коллагеновых структур и их взаиморасположения. Таким образом, особенности изменений линейных размеров глаза, нарушений морфофункционального состояния склеры у экспериментальных животных качественно и количественно сопоставимы с изменениями у пациентов с миопией, что позволяет считать депривационную модель миопии у крыс адекватной, отражающей основные морфологические механизмы возникновения и прогрессирования заболевания.

Выводы

Депривация зрения у крыс, путем блефарофании, сопровождается увеличением темпа роста линейных размеров глазного яблока, в большей степени сагитального, по сравнению с интактными животными ($p < 0,05$), что свидетельствует о развитии осевой миопии. В склере экваториальной области глазного яблока при воспроизведении депривационной модели миопии у крыс выявлены минимальные изменения в виде отека

коллагеновых фибрилл. В склере заднего полюса глазного яблока выявлены нарушения архитектоники и структуры коллагеновых фибрилл, дегенеративные и деструктивные изменения фибробластов, деформация склерального кольца, что может быть признаком развивающейся миопиче-

ской стафиломы склеры.

Перспективы дальнейших разработок

Исследовать особенности нейрогуморальной регуляции метаболизма склеры при экспериментальной миопии у крыс.

Литературные источники

References

1. Beuerman RW, Saw SM, Tan DT, Wong TY. Myopia: animal models to clinical trials. Singapore: World Scientific; 2010. 390 p.
2. Mathis U, Schaeffel F. Transforming growth factor-beta in the chicken fundal layers: an immunohistochemical study. *Exp Eye Res.* 2010;90(6):780-90.
3. Ulyanova NA. [Age features of eyeball envelopes structure]. *Morphologia.* 2014;8(1):95-8. Russian.
4. Fang F, Pan M, Yan T, Tao Y, Wu H, Liu X, Qu J, Zhou X. The role of cGMP in ocular growth and the development of form-deprivation myopia in guinea pigs. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(13):7887-902.
5. Mishalov VD, Chaikovskiy YuB, Tverdokhle IV. [About legal, legislative, ethical standards and requirements at performance scientific researches]. *Morphologia.* 2007;1(2):108-15. Russian.
6. Beuerman RW, Saw SM, Tan DT, Wong TY. Myopia: animal models to clinical trials. Singapore: World Scientific; 2010. 390 p.
7. Sarkisov DS., Perov JuS. [Microscopic technique]. Moscow: Medicine; 1996. 544p. Russian.
8. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* 1963;17:208-12.
9. Glanc S. [Biomedical statistics]. Moscow: Praktika; 1998. 459 p. Russian.
10. Ulyanova NA, Dumbrova NE, Molchanyuk NI. [Age ultrastructural features of sclera in intact rats]. *Morphologia.* 2013;7(4):67-72. Russian.

Ульянова Н.А., Думброва Н.С., Молчанюк Н.І. Морфологічні зміни склери за умов моделювання міопії.

Реферат. Мета: дослідити зміни лінійних розмірів очного яблука та морфологічні особливості склери при моделюванні деприваційної міопії у щурів. У щурів у віці 14 днів моделювали деприваційну міопію шляхом блефарорафії. Досліджували лінійні розміри очного яблука і морфологічні властивості склери на 7-у і 14-у добу експерименту. Властивості склери досліджували на світлооптичному і електронно мікроскопічному рівні. Депривація зору у щурів призводить до збільшення темпу зростання лінійних розмірів очного яблука, більшою мірою сагітального, в порівнянні з інтактними тваринами ($p < 0,05$), що свідчить про розвиток осрової міопії. У склері екваторіальної області міопічного очного яблука виявлені мінімальні зміни у вигляді набряку колагенових фібрил. У склері заднього полюса очного яблука виявлені порушення архітектоники і структури колагенових фібрил, дегенеративні і деструктивні зміни фібробластів, деформація склерального кільця, що є ознакою розвитку міопічної стафіломи склери.

Ключові слова: склера, міопія, гістоструктура, ультраструктура.