

БИОГЕРОНТОЛОГИЯ

ИЗУЧЕНИЕ РЕТИНОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ЭПИТАЛОНА У КРЫС CAMPBELL РАЗНОГО ВОЗРАСТА

В.Х.Хавинсон, М.И.Разумовский, С.В.Трофимова, А.М.Разумовская

Санкт-Петербургский Институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН

Изучали ретинопротекторное действие пептида эпیتالона при введении его потомству крыс Campbell в постнатальный период жизни и их матерям до зачатия и во время беременности. Установлено, что данный метод введения эпیتالона позволяет увеличить период сохранения морфологической структуры и функциональной активности сетчатки в 2 раза по сравнению с контролем и на 30% по сравнению с введением пептида только в постнатальный период жизни крыс.

Ключевые слова: пептиды, эпیتالон, пигментная дегенерация сетчатки, крысы линии Campbell

Наследственные дегенеративные изменения в сетчатке глаза у животных (кошка, крыса, собака и др.) и у человека заключаются в прогрессирующей атрофии фоторецепторных клеток и, как правило, проявляются в начальные периоды постнатальной жизни [2].

В предыдущих исследованиях нами было изучено влияние эпیتالона (Ala-Glu-Asp-Gly) на состояние сетчатки крыс линии Campbell, для которых характерна наследственная пигментная дистрофия сетчатки. Установлено, что применение эпیتالона крысам с рождения позволяет увеличить функциональную активность на 43.9 и 75.6% период сохранения морфологической структуры сетчатки крыс по сравнению с контролем за счет ретинопротекторного действия пептида [1,5,6]. Известно, что пигментная дегенерация сетчатки является генетически детерминированным заболеванием. Однако отмечена также возможность возникновения дистрофии за счет повреждающих воздействий в период внутриутробного развития плода (эмбриопатии) [3,4].

Целью нашей работы явилась оценка ретинопротекторного действия эпیتالона при введении пептида не только потомству в постна-

тальный период жизни, но и матерям крысам Campbell до зачатия и во время беременности.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В опыте использовали крыс линии Campbell, страдающих врожденной пигментной дистрофией сетчатки.

Исследования были проведены на 183 крысах: 43 самках и 140 крысят. Эксперимент проходил в два этапа. На первом этапе самки опытной группы ($n=25$) в течение 3 нед до спаривания и весь период беременности получали внутримышечно эпیتالон в дозе 1.0 мкг (в 0.2 мл стерильного 0.9% NaCl) на животное. Самки контрольной группы ($n=18$) получали по аналогичной схеме 0.2 мл стерильного 0.9% NaCl. Второй этап эксперимента проводился только на потомстве. Крысам опытной группы ($n=78$) эпیتالон вводили внутримышечно с 5-х суток постнатальной жизни в дозе 0.5 мкг до 35-х суток, затем в дозе 1.0 мкг до 81-х суток в объеме 0.2 мл на животное. Инъекции выполняли 5 дней в неделю с последующим недельным перерывом. Животным контрольной группы ($n=62$) по аналогичной схеме вводили 0.2 мл стерильного 0.9% NaCl.

Ретинопротекторное действие эпیتالона оценивали электрофизиологически только у потомства. Электроретинограмма (ЭРГ) — графиче-

Адрес для корреспонденции: 197110 Санкт-Петербург, пр. Динамо, д. 3. Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН. ibg4@medport.ru. Хавинсон В.Х.

ческое отображение изменений биоэлектрической активности клеточных элементов сетчатки в ответ на световое раздражение. ЭРГ отражает активность большинства клеточных элементов сетчатки и зависит от количества здоровых функционирующих клеток. Поэтому данный метод исследования является ведущим в оценке функциональной способности сетчатки и позволяет диагностировать патологию на субклиническом уровне. Для регистрации ЭРГ использовали 3-канальную электрофизиологическую установку, позволяющую записывать ЭРГ у крыс в условиях затемненной экранированной камеры. Регистрацию ЭРГ производили на движущуюся со скоростью 25 мм/с бумагу. В качестве предварительного усилителя потенциалов ЭРГ использовали универсальный усилитель с фильтрами, пропускавшими частоты от 1 до 30 Гц. Окончательное усиление достигалось использованием усилителя чернильно-пишущего самописца Н-3273. Источником вспышек служил стандартный фотостимулятор ("ФС-02" производства Львовского завода электро медицинской аппаратуры), применяемый для регистрации энцефалограмм. Интенсивность световой вспышки равнялась 500 кд/м² с длительностью 50 мс. ЭРГ регистрировали хлорсеребряным пружинным электродом с пуговкой на конце, осторожно прикладываемой с помощью микроманипулятора на роговицу глаза. Референтный электрод в виде заостренной иглы закреплялся в коже на голове животного. ЭРГ одновременно регистрировали на осциллографе.

Все эксперименты проводили под обязательным обезболиванием животных путем парентерального введения уретана (из расчета 150 мг/кг). Крыс с помощью головодержателя закрепляли в стереоаппарате, затем нитями оттягивали верхнее и нижнее веки и после 10 мин адаптации к темноте подавали световые вспышки в случайном режиме, но не реже одного раза в 5 с. ЭРГ регистрировали в контрольной и опытной группах с 17-х суток (к этому сроку у всех крыс открывались глаза) и до момента, когда уже не удавалось получить ответ. Обработку полученных записей ЭРГ проводили вручную, измеряя

по калибровке усиления усредненную величину суммарной амплитуды волн "а", "b", "с". Полученные данные свидетельствовали об общей биоэлектрической активности сетчатки. Данная величина отражала суммарную величину рецепторных потенциалов первой быстрой волны (волна "а"), изменения мембранного потенциала глиальных, мюллеровских клеток (более медленная и самая большая волна "b") и изменения мембранного потенциала клеток пигментного эпителия (волна "с").

Морфологические исследования проводили в опытной и контрольной группах животных. С этой целью животных декапитировали (по 4-5 особей на каждое исследование) с последующей энуклеацией на 23, 35, 41, 53, 65, 71, 81-е сутки. Материал (глазное яблоко) фиксировали в нейтральном формалине. Депарафинированные сагитальные срезы глазного яблока окрашивали гематоксилином и эозином. Морфометрический анализ препаратов проводили при увеличении в 700 раз, который включал определение толщины внутреннего плексиформного слоя, внутреннего и наружного ядерного слоев, а также рецепторного слоя.

Статистическую обработку проводили при помощи программы "Statistica".

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате проведенного исследования на 23-и сутки не установлено статистически значимых изменений суммарной биоэлектрической активности в основной и контрольной группах (таблица).

Однако, начиная с 35-х суток жизни, у крыс контрольной группы отмечено снижение биоэлектрической активности сетчатки, а к 53-м суткам ни у одного животного не была зарегистрирована ЭРГ. У крыс опытной группы после 41-х суток постнатальной жизни амплитуда ЭРГ удерживалась на относительно высоком уровне и только с 70-х суток онтогенеза начинала снижаться. К сожалению, наш эксперимент был запланирован только до 81-х суток, поэтому мы не смогли установить точную дату прекращения регистрации ЭРГ в опытной группе.

Биоэлектрическая активность (суммарная амплитуда волн ЭРГ, мкВ) сетчатки крыс Campbell

Группа	Срок наблюдения, сут						
	23-и	35-е	41-е	53-и	65-е	71-е	81-е
Контроль	90.5±11.2	80.5±9.2	38.4±7.4	0	0	0	0
Опыт	94.5±12.1	106.6±13.3*	107.1±12.8*	91.4±11.7	68.3±9.5	54.1±8.4	21.6±5.8

*Значение. *p<0.05 по сравнению с контролем



Морфологическая картина сетчатки крыс Campbell на 41-е сутки жизни в контроле (а) и при введении эпیتالона на 71-е (б), 81-е (в) сутки. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 210$.

Сравнение гистологических препаратов сетчатки глаз крыс основной и контрольной групп на 35-е сутки показало большую сохранность морфологических структур сетчатки под действием эпیتالона: ярче был окрашен слой фоторецепторов, все слои имели более четкие границы. У животных контрольной группы произошло сужение всех слоев сетчатки: ядерного слоя, фоторецепторного слоя, наружного плексиформного слоя, содержащего синясы палочек и колбочек с горизонтальными и биполярными клетками. Таким образом, произошло сближение внутреннего ядерного слоя, содержащего амачиновые, биполярные и горизонтальные клетки с наружным ядерным слоем, представляющим собой ядра колбочек и палочек. Эти процессы развивались постепенно. При сравнении морфологической картины животных обеих групп на 41-е сутки жизни отмечена существенная разница в строении сетчатки. Так, у крыс контрольной группы наблюдалась деструкция всех слоев сетчатки, в то время как морфологическая картина в основной группе оставалась сохранной. Наибольший интерес представляют собой препараты сетчатки глаз крыс под действием эпیتالона на 71-е и 81-е сутки (рисунки б, в). Так, на 71-е сутки по сравнению с более ранними сроками, хотя и наблюдается частичная деструкция слоев сетчатки (сужение наружного плексиформного слоя, сближение наружного и внутреннего ядерных слоев), тем не менее слой фоторецепторов, несмотря на частичное сужение, сохраняется и интенсивно окрашивается. Необходимо отметить, что даже на 81-е сутки,

несмотря на деструктивные изменения в сетчатке, некоторые функциональные элементы ее сохранялись. Таким образом, сравнивая гистологические картины сетчатки в контроле и опыте следует отметить, что применение эпیتالона способствует удлинению как минимум в 2 раза периода сохранения морфологической структуры сетчатки крыс.

Итак, введение пептида эпیتالона крысам с наследственной пигментной дегенерацией сетчатки способствовало удлинению периода сохранения морфологической структуры и функциональной активности сетчатки в 2 раза по сравнению с контролем и на 30% по сравнению с введением пептида только в постнатальный период жизни крыс. Таким образом, введение эпیتالона не только потомству, но и крысам-самкам до зачатия и в период беременности усиливает ретинопротекторное действие пептида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хавинсон В.Х., Разумовский М.И., Трофимова С.В. и др. // Бюл. экпер. биол. 2002. Т. 133, № 1. С. 102-105.
2. Шашинова А.М., Волков В.В. Функциональные методы исследования в офтальмологии. М., 1998.
3. Cooburn D., Amstutz J. Ophthalmol. 1985. Vol. 68. P. 138-143.
4. Friedman N.J., Pineda H.R., Kaiser P.K. The Massachusetts eye and ear infirmary illustrated manual of ophthalmology. Philadelphia, 1998.
5. Khavinson V. Neuroendocrinol. Lett. Suppl. 3. 2002. P. 11-144.
6. Khavinson V., Razumovsky M., Trofimova S. et al. // Neuroendocrinol. Lett. Vol. 23, N 4. 2002. P. 365-368.

Получено 30.01.03