

# Реакция нейронов внутренних слоев сетчатки глаза на комбинированное воздействие ионизирующей радиации и света

*Потапов А.В., Светлик М.В.*

## Reaction of neurons of internal layers of the retina to combined influence of ionizing radiation and light

*Potapov A.V., Svetlik M.V.*

*Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск*

© Потапов А.В., Светлик М.В.

Целью настоящей работы являлось установление характера модифицирующего влияния ионизирующей радиации на повреждение нейронов внутреннего ядерного и ганглионарного слоев сетчатки, вызываемые светом.

Исследование показало, что изменения нейронов внутреннего ядерного и ганглионарного слоев после рентгеновского, светового (200 лк, 1, 2, 7, 14, 30 сут) и комбинированного воздействий носят сходный характер, но различаются по степени выраженности и проявляются реактивными и деструктивными изменениями органелл. Ассоциативные нейроны показали относительную резистентность к изучаемым воздействиям по сравнению с мультиполярными нейронами ганглионарного слоя. Комбинированное облучение ионизирующей радиацией и светом вызывает значительное увеличение количества гиперхромных и пикнотичных мультиполярных нейронов ганглионарного слоя сетчатки. Синергический эффект наиболее выражен на 7—14-е сут эксперимента и проявляется прогрессирующим увеличением числа гиперхромных мультиполярных нейронов.

**Ключевые слова:** ассоциативные, мультиполярные нейроны, свет, рентгеновское излучение.

The purpose of the presented work was the establishment of a character of modifying influence of ionizing radiation on damages of neurons of internal nuclear and ganglionic layers of a retina caused by light.

The investigation revealed that changes of neurons of the internal nuclear and ganglionic layers after X-ray, light (200 lk, the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup> days) and combined influence have similar nature, but differ in a degree of expression and manifest by reactive and destructive changes of organelles. Associated neurons showed relative resistance to investigated influences in comparison with multi-polar neurons of ganglionic layer. Combined ionizing radiation and light cause substantial growth of number of hyperchrome and picnotic multi-polar neurons of ganglionic layer of a retina. Synergic effect is mostly expressed on 7-th-14-th day of the experiment and results in progressing growth of the number of hyper chrome multi-polar neurons.

**Key words:** associative, multipolar neurons, light, X-ray radiation.

УДК 617.735:616-001.28/.29:616-001.14/.15

### Введение

Повреждения сетчатой оболочки глаза человека наблюдаются даже при применении в клинике офтальмоскопической техники и операционных микроскопов [6, 7, 10]. К настоящему времени накоплена значительная информация, касающаяся клинико-эпидемиологических и функциональных нарушений зрительного анализатора при воздействии ионизирующей радиации и света. В литературе подавляющее большинство авторов отмечают повреждающее действие света различной интенсивности на компоненты

гематоретинального барьера и нейросенсорные клетки [5, 8, 9, 11]. Крайне мало сведений о реакции и количественной оценке изменений на световое и комбинированное облучения ассоциативных и ганглионарных нейронов сетчатки.

Цель настоящей работы — установить характер модифицирующего влияния ионизирующей радиации на повреждение нейронов внутреннего ядерного и ганглионарного слоев сетчатки, вызываемые светом.

### Материал и методы

Эксперименты проведены на 100 беспородных половозрелых белых крысах обоего пола массой 180—200 г. Животных 1-й группы ( $n = 25$ ) в течение 1, 2, 7, 14, 30 сут подвергали равномерному облучению люминесцентными лампами ЛБ-40. Освещенность крыс составила 200 лк. Крыс 2-й группы ( $n = 25$ ) подвергали однократному тотальному рентгеновскому облучению в дозе 5 Гр с помощью аппарата РУМ-17 (Россия),

а крыс 3-й группы ( $n = 25$ ) — комбинированному воздействию рентгеновского излучения и света в указанных параметрах с интервалом в 1 ч. Количество животных на каждую экспериментальную точку — 5. В качестве контроля использовали интактных крыс ( $n = 25$ ), содержащихся в условиях искусственного светового режима (12 ч — день, 12 ч — ночь). Интенсивность дневного освещения составляла 25 лк. Забор материала осуществляли декапитацией сразу после экспериментального воздействия и через 1, 2, 7, 14, 30 сут.

Глазные яблоки фиксировали в жидкости Карнуа и заливали в парафин. Для ультраструктурного анализа центральные участки задней стенки глаза фиксировали в 2,5%-м глютаральдегиде на какодилатном буфере (рН = 7,4). Материал постфиксировали в 2%-м растворе четырехоксида осмия и заливали в эпон. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, просматривали и фотографировали в электронном микроскопе JEM-100 CX-II (Япония). На поперечных срезах сетчатки толщиной 5—7 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином, подсчитывали количество ассоциативных и ганглионарных нейронов в поле зрения, определяли их соотношение. На полутонких срезах, окрашенных толудиновым синим, вычисляли процент гиперхромных и пикноморфных нейронов внутреннего ядерного и ганглионарного слоев на 200 клеток с каждой сетчатки. Подсчет клеток производили в окулярной рамке на площади  $900 \text{ мкм}^2$  с пяти срезов с каждой сетчатки при увеличении  $10 \times 90$ .

При проведении статистической обработки результатов использованы методы описательной статистики (определение среднего значения  $M$  и ошибки среднего  $m$ ), непараметрический критерий Манна—Уитни. Критический уровень значимости  $p$  задавался величиной 0,05. По данным экспериментов проводи-

лось построение математической модели изменений при помощи методов обобщенной регрессии, реализованных в программной среде mathCAD.

## Результаты и обсуждение

Изменения горизонтальных нейронов внутреннего ядерного слоя во все сроки эксперимента проявляются набуханием и отеком цитоплазмы различной степени выраженности. Ультрамикроскопически выявляются расширение цистерн эндоплазматического ретикулама, набухание и частичная деструкция крист митохондрий. Необходимо отметить, что единичные горизонтальные нейроны, измененные подобным образом, встречаются и в контроле.

Биполярные и особенно амакринные нейроны подвергаются не только реактивным, но и деструктивным изменениям. При этом амакринные нейроны чаще вовлекаются в деструктивные процессы по сравнению с биполярными нейронами. После 1—2 сут светового и рентгеновского облучений ассоциативные нейроны характеризуются набуханием митохондрий, расширением цистерн эндоплазматического ретикулама. В мультиполярных нейронах ганглионарного слоя наблюдается расширение цистерн эндоплазматической сети, набухание митохондрий, уменьшение числа полисом и появление микровезикул в цитоплазме.

После 7 сут светового облучения ассоциативные нейроны внутреннего ядерного слоя можно разделить на два типа: «светлые» и «темные». Перикарионы «светлых» клеток отечные. В их цитоплазме наблюдается деструкция органелл, гипертрофия комплекса Гольджи, содержится большое количество отечных митохондрий. «Темные» характеризуются более конденсированным хроматином в ядре и меньшими размерами клеток. В них увеличено число органелл, а цитоплазма содержит много свободных рибосом. Данные клетки располагаются на границе с наружным сетчатым слоем. После 14—30 сут светового воздействия в ассоциативных нейронах внутреннего ядерного слоя наблюдается вакуолизация цитоплазмы и деструкция органелл.

После 1—2 сут комбинированного воздействия изменения внутреннего ядерного слоя характеризуются явлениями отека цитоплазмы и части органелл биполярных и амакринных нейронов. Небольшая часть нервных клеток гиперхромна и пикноморфна. Ганг-

лионарные нейроны характеризуются появлением вакуолей и деструкцией митохондрий.

После 7—14 сут комбинированного облучения одновременно с деструктивными процессами в ассоциативных нейронах наблюдаются реактивные изменения, характеризующиеся складчатостью ядра, набуханием митохондрий, расширением цистерн эндоплазматической сети. В нейrocитах выявляются морфологические признаки репаративных процессов, которые характеризуются увеличением в цитоплазме числа свободных рибосом, повышением содержания гранулярного компонента ядрышек и увеличением числа последних. После 30 сут комбинированного облучения наряду с репаративными процессами в части нейронов внутреннего ядерного слоя деструктивные изменения усиливаются, что характеризуется появлением крупных вакуолей, более грубой деструкцией митохондрий и образованием в цитоплазме мембранных комплексов и миелиноподобных тел.

После 7 сут светового и комбинированного облучений структурные изменения мультиполярных нейронов ганглионарного слоя носят сходный характер. Среди них появляются «темные» клетки, которые характеризуются деформацией ядра и перикариона, высокой электронной плотностью кардио- и цитоплазмы, редукцией органелл. В некоторых ганглионарных нейронах, напротив, наблюдается повышение содержания первичных и вторичных лизосом. В поздние сроки (через 14, 30 сут) после воздействия рентгеновского излучения мультиполярные нейроны ганглионарного слоя по своему строению не отличаются от такового в контроле, а в соответствующие сроки светового и комбинированного облучений изменения сохраняются и прогрессируют. В цитоплазме данных нейронов наблюдается появление мембранных комплексов и миелиноподобных тел.

На рис. 1 отражена динамика изменений содержания гиперхромных и пикноморфных ассоциативных нейронов внутреннего ядерного слоя после воздействия изучаемых факторов. Через 1 сут после окончания воздействия ионизирующей радиации число гиперхромных ассоциативных нейронов увеличивается в 2 раза относительно контроля ( $p < 0,05$ ). На 14-е сут эксперимента содержание данных клеток достигает  $(3,16 \pm 0,74)\%$  (в контроле —  $(0,50 \pm 0,13)\%$ ) и не меняется до 30-х сут эксперимента ( $p < 0,05$ ).

После 7 сут облучения светом содержание гиперхромных ассоциативных нейронов возрастает до  $(14,67 \pm 3,25)\%$ , что в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) больше соответствующих значений после комбинированного воздействия. Дальнейший анализ данного показателя свидетельствует о том, что после 30 сут облучения он снижается в 2,3 раза, превышая соответствующие значения в контроле ( $p < 0,05$ ). Различий в количестве гиперхромных ассоциативных нейронов после 14, 30 сут светового и комбинированного облучений не выявлено ( $p < 0,05$ ).

После воздействия ионизирующей радиации и света во все сроки эксперимента число пикноморфных нейронов внутреннего ядерного слоя достоверно не превышает таковое в контроле ( $p < 0,05$ ).

После 7 сут комбинированного облучения содержание пикноморфных ассоциативных нейронов в 1,4 раза превышает соответствующие значения после светового облучения ( $p < 0,05$ ). Дальнейший анализ динамики изменений указанного показателя свидетельствует о его повышении, и на 30-е сут эксперимента он достигает  $(4,46 \pm 1,22)\%$  (в контроле —  $(1,94 \pm 0,23)\%$ ), что, по-видимому, свидетельствует об усилении деструктивных процессов в указанный срок.

На 14-е сут после воздействия ионизирующей радиацией содержание гиперхромных мультиполярных нейронов ганглионарного слоя достоверно в 2 раза превышает контрольные значения, но к 30-м сут происходит снижение данного показателя до значений в контрольной группе (рис. 2). После 7 сут комбинированного воздействия число гиперхромных ганглионарных нейронов в 3,8 раза, а число пикноморфных мультиполярных нейронов ганглионарного слоя в 6 раз превышает соответствующие значения в серии со световым воздействием.

После 14 сут комбинированного облучения содержание гиперхромных мультиполярных нейронов ганглионарного слоя максимально в данной серии эксперимента и составляет  $(28,97 \pm 2,15)\%$  (контроль —  $(3,40 \pm 2,83)\%$ ), превышая данный показатель после светового воздействия в 7,6 раза ( $p < 0,05$ ). После 30 сут комбинированного воздействия количество пикноморфных ганглионарных нейронов снижается, по-видимому, за счет фагоцитоза деструктивно измененных клеток радикальными глиоцитами и астроцитами и составляет

(6,67 ± ± 2,42)%.

Анализ среднего количества ассоциативных и мультиполярных нейронов ганглионарного слоя в поле зрения после ионизирующего, светового и комби-

нированного воздействий свидетельствует о том, что число данных клеток остается неизменным и достоверно не отличается от контрольных значений во всех сериях группы.

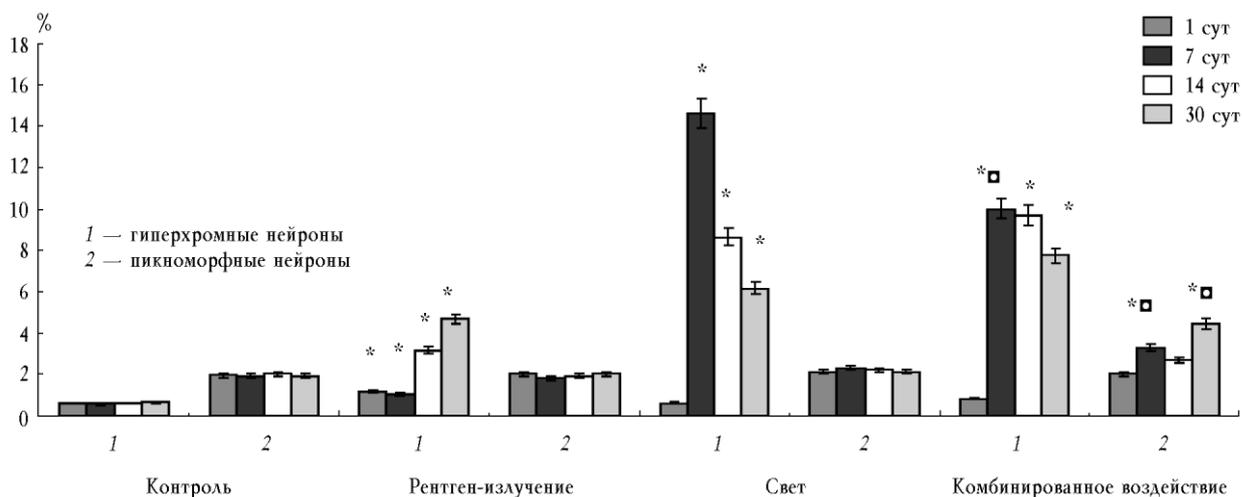


Рис. 1. Содержание гиперхромных и пикноморфных нейронов внутреннего ядерного слоя после ионизирующего (5 Гр), светового (200 лк) и комбинированного облучений. Здесь и на рис. 2 статистически достоверные отличия  $p < 0,05$  при сравнении: \* — различных облучений с контролем; ■ — комбинированного и светового воздействий

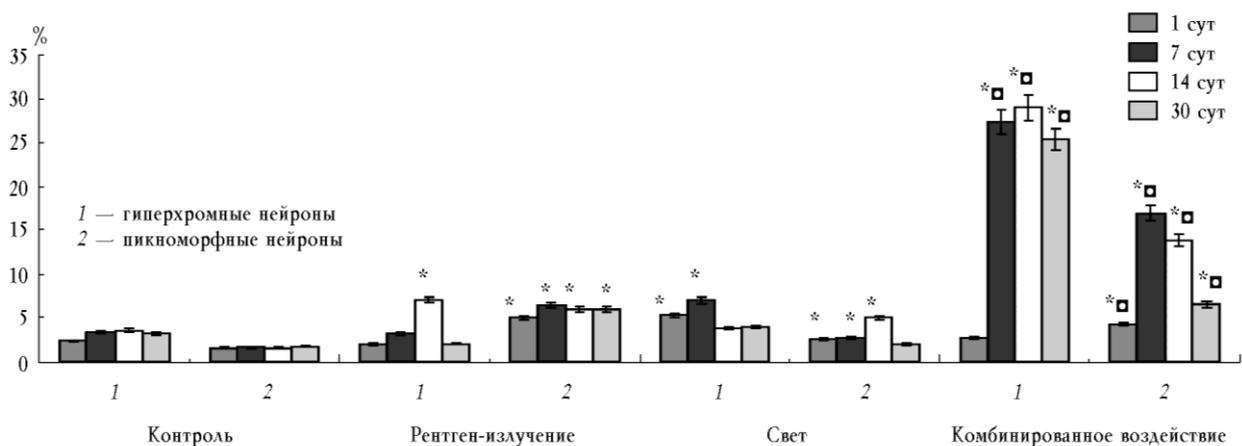


Рис. 2. Содержание гиперхромных и пикноморфных нейронов ганглионарного слоя после ионизирующего (5 Гр), светового (200 лк) и комбинированного облучений

В результате проведенного математического моделирования было показано, что содержание гиперхромных и пикноморфных нейронов внутренних слоев сетчатки после воздействия ионизирующей радиацией (5 Гр), светом низкой интенсивности и их комбинации могут быть описаны следующими функциями:

для рентгеновского излучения в дозе 5 Гр

$$F(T) = a_0t + a_1t^{2/3} + a_2t^{3/4} + a_3e^{-t};$$

для светового и комбинированного воздействий

$$F(T) = a_0t + a_1t^{1/2} + a_2t^{3/2} + a_3e^{-t},$$

где  $F(T)$  — количество гиперхромных и пикноморфных клеток;  $a_i$  — коэффициенты, полученные при мо-

делировании, для соответствующего пула клеток (таблица);  $t$  — время воздействия, сут.

Таким образом, изменения нейронов внутреннего ядерного и ганглионарного слоев после рентгеновского, светового и комбинированного воздействий носят сходный характер, но различаются по степени выраженности

и проявляются реактивными и деструктивными изменениями органелл. Ассоциативные нейроны в ходе настоящего исследования показали относительную резистентность к изучаемым воздействиям по сравнению с мультиполярными нейронами ганглионарного слоя.

Коэффициенты, полученные при моделировании

Вид клеток	Облучение	$a_0$	$a_1$	$a_2$	$a_3$
<i>Гиперхромные нейроны</i>					
Ассоциативные	Рентген	0,634	-0,044	0,014	0,618
	Свет	-1,748	5,906	0,148	2,716
	Комбинированное	2,777	-1,465	-0,410	0,337
Ганглионарные	Рентген	-0,821	1,620	-0,255	3,133
	Свет	5,137	-0,888	-0,743	6,406
	Комбинированное	7,719	-4,184	-1,127	2,275
<i>Пикноморфные нейроны</i>					
Ассоциативные	Рентген	1,876	-0,522	0,045	1,991
	Свет	-0,687	3,478	0,040	5,008
	Комбинированное	-0,732	2,365	0,080	1,800
Ганглионарные	Рентген	4,852	-1,439	0,132	5,066
	Свет	-2,235	8,420	0,146	2,959
	Комбинированное	2,295	1,909	-0,446	4,658

## Заключение

Комбинированное облучение ионизирующей радиацией и светом вызывает увеличение количества гиперхромных и пикноморфных нейронов внутренних слоев сетчатки по сравнению с таковым при изолированном действии факторов. Синергический эффект наиболее выражен на 7—14-е сут эксперимента и проявляется прогрессирующим увеличением числа гиперхромных мультиполярных нейронов. В данных клетках наблюдается гипертрофия комплекса Гольджи, набухание и просветление матрикса митохондрий. Это особое состояние мембранных систем свидетельствует об их участии в метаболических перестройках, происходящих в данной клетке [1, 3]. Ультрамикроскопическое исследование указывает на содержание в ядре большого количества неконденсированного хроматина, рассеянных по нуклеоплазме интерхроматиновых и гетерохроматиновых гранул, перихроматиновых фибрилл. Данные изменения отражают происходящий в ядрах клеток процесс создания мРНК, который становится матрицей для формирования полисом, определяющих в большом количестве вместе со свободными рибосомами осмиофилию перикарионов «темных» клеток [2]. Следовательно, изучаемые воздействия усиливают функциональную активность нейронов

и приводят к мобилизации всех имеющихся в ней ультраструктур. Необходимо отметить также, что существует мнение, о том, что гиперхромные «темные» нейроны находятся в заторможенном состоянии [4].

Литература

1. Ахмадеев А.В., Калимулина Л.Б., Минабаева З.Р. Нейро-секреторные клетки миндалевидного комплекса мозга // Бюл. эксперим. биологии. 1999. Т. 119. № 4. С. 368—374.
2. Витвицкая Л.В. Сравнительный анализ функций генома в клетках мозга при формировании адаптивного поведения у животного разного уровня онто- и филогенеза: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 1991. 29 с.
3. Голубовский М.Д. Организация генотипа и формирование наследственной изменчивости эукариотов // Успехи соврем. биологии. 1985. Т. 100. № 3. С. 323—331.
4. Калимулина Л.В. Вопрос о «темных» и «светлых» клетках // Морфология. 2002. Т. 122. № 4. С. 75—80.
5. Goide R., Ueda T.N., Dawson W.W. et al. Retinal hazard from blue light emitting diode // Nippon. Ganka. Gakkai. Zasshi. 2001. V. 105. № 10. P. 687—695.
6. Kleinmann G., Hoffman P., Schechtman E., Pollack A. Microscope-induced retinal phototoxicity in cataract surgery of short duration // Ophthalmology. 2002. V. 109. № 2. P. 334—338.
7. Kohnen S. Light-induced damage of the retina through slit-lamp photography // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 2000. V. 238. № 12. P. 956—959.
8. Li F., Cao W., Anderson R.E. Alleviation of constant-light-induced photoreceptor degeneration by adaptation of adult albino rat to bright cyclic light // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2003. V. 44. № 11. P. 4968—4975.
9. Masuda K., Watanabe I. Short wavelength light-induced retinal damage in rats // Jpn. J. Ophthalmol. 2000. V. 44. № 6. P. 615—619.
10. Michael R., Wegener A. Estimation of safe exposure time from an ophthalmic operating microscope with regard to ultraviolet radiation and blue-light hazards to the eye // J. Opt. Soc. Am. A. Opt. Image Sci. Vis. 2004. V. 21. № 8. P. 1388—1392.
11. Walsh N., Valter K., Stone J. Cellular and subcellular patterns of expression of bFGF and CNTF in the normal and light stressed adult rat retina. // Exp. Eye. Res. 2001 V. 72. № 5. P. 495—501.

Поступила в редакцию 20.03.2006 г.