

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 1st, 2nd, 7th, 14th, 30th 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 мкм^2 с пяти срезов с каждой сетчатки при увеличении 10×90 .

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.

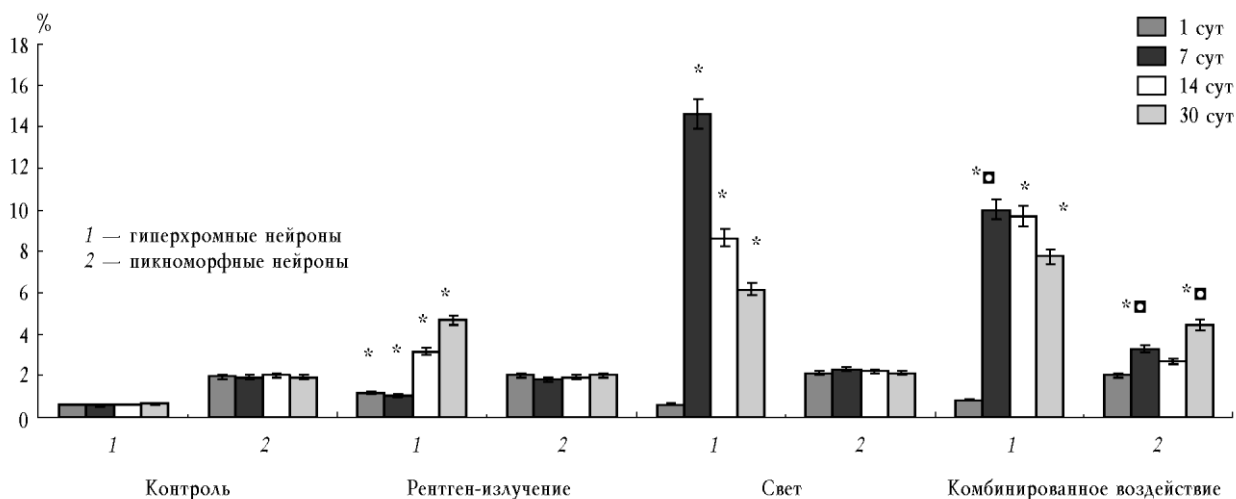


Рис. 1. Содержание гиперхромных и пикноморфных нейронов внутреннего ядерного слоя после ионизирующего (5 Гр), светового (200 лк) и комбинированного облучений. Здесь и на рис. 2 статистически достоверные отличия $p < 0,05$ при сравнении: * — различных облучений с контролем; ■ — комбинированного и светового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

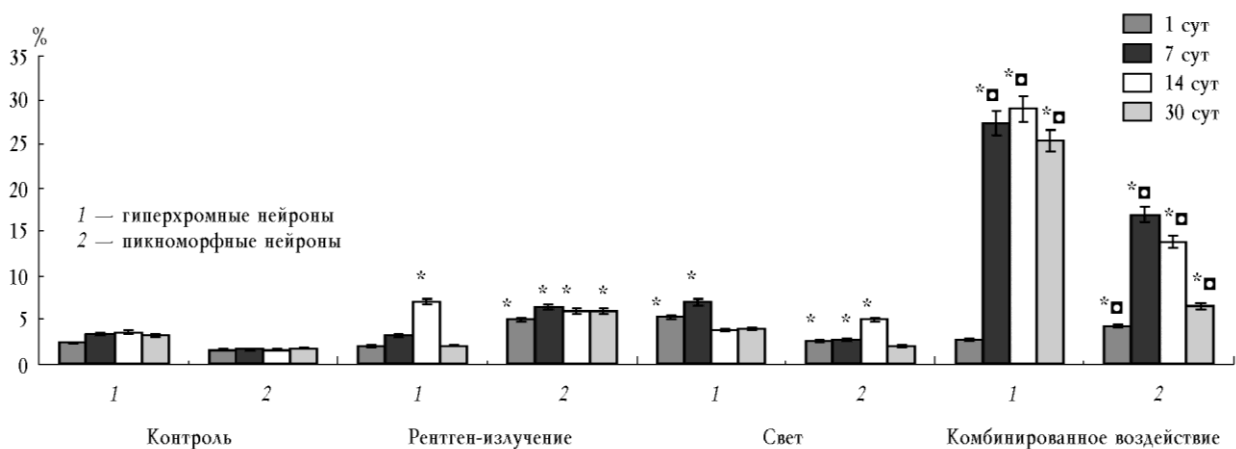


Рис. 2. Содержание гиперхромных и пикноморфных нейронов ганглионарного слоя после ионизирующего (5 Гр), светового (200 лк) и комбинированного облучений

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.