

На правах рукописи

Мустафина Лилия Рамильевна

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЛЕЗНОГО АППАРАТА И
РОГОВИЦЫ ГЛАЗА ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ
ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ И СВЕТА
(экспериментальное исследование)

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2006 г.

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Логвинов Сергей Валентинович

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Красноженов Евгений Павлович

кандидат медицинских наук
Васильев Николай Вольтович

Ведущая организация: ГОУ ВПО Новосибирский государственный
медицинский университет Росздрава

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2006 г. в ____ часов
на заседании диссертационного совета Д 208.096.03 при ГОУ ВПО СибГМУ
Росздрава, по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГОУ
ВПО СибГМУ Росздрава (634050, г. Томск, пр. Ленина, 107).

Автореферат разослан « ____ » _____ 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Герасимов А.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Проблеме влияния ионизирующей радиации и света на организм посвящено большое количество исследований. Воздействие радиации на человека имеет место при работе с радионуклидами в промышленности, в сельском хозяйстве, в ядерной энергетике, радиационные источники широко применяются в медицине для диагностики заболеваний и лечения злокачественных новообразований. Следует отметить, что помимо производственного облучения, каждый человек, особенно живущий в крупном городе, подвергается воздействию естественного и бытового радиационного фона.

Эффекты влияния ионизирующей радиации на глаза варьируют в широких пределах. В результате рентгенотерапии при злокачественных новообразованиях органа зрения во вспомогательном аппарате глаза развиваются различные лучевые повреждения. При поражении слезных желез нарушается качественный состав слезной жидкости, которая в норме не только увлажняет поверхность роговицы, но и содержит факторы иммунной [Di Matteo L. et al., 1989] и антиоксидантной защиты [Гулидова О.В. и др., 1999]. В результате уменьшается слезоотделение с последующей сухостью конъюнктивального мешка и роговицы, что в конечном итоге отрицательно сказывается на зрении. Серьезным последствием является повреждение роговицы, которое вызывает нарушение ее прозрачности и снижение остроты зрения [Зацепин Д.И., 1959; Алиева З.А. и др., 1988], что в последующем может приводить к развитию рубцового кератоза и полной утрате зрения [Lederman M. et al., 1969; Карп Л. et al., 1979]. Еще более серьезными последствиями являются язвы роговой оболочки в результате облучения в больших дозах, которые могут привести к перфорации и потере глаза [Зацепин Д.И., 1959].

Повреждающее действие света на глаз и слезные органы может возникать как под влиянием прямого и отраженного солнечного света, так и искусственно созданных светотехнических устройств. Световое излучение высокой интенсивности встречается в производстве, в быту, в военном деле, а также в медицине (лазер). Эффекты действия света на орган зрения и вспомогательный аппарат глаза может быть различным в зависимости от длины волны, мощности и длительности воздействия. Эти параметры являются определяющими как для обычных световых, так и для лазерных излучений. Воздействие ярким светом вызывает болевые ощущения, светобоязнь, миоз [Преображенский П.В. и др., 1986].

В литературе накоплены данные о влиянии света, а также ионизирующей радиации на различные структуры глаза. Проведены исследования по изучению структурных изменений передних отделов глаза, возникающих в результате светового и ультрафиолетового излучения [Эмилиит В.А., 1968; Гентер В.И., 1971; Mainster M.A., 1978; Sliney D.N., 1983]. Детально исследованы повреждения пигментоэпителиоцитов и фоторецепторов сетчатки [Ando H. et al., 1993; Rapp L.M. et al., 1994; Koutz R. et al., 1995]. Изучались морфологические изменения слезных органов при

лучевой болезни [Рыжов А.И. и др., 1975; Логвинов С.В., 1985; Balik I., 1966; Karp L. et al., 1979]. Описаны процессы повреждения и репарации структурных компонентов сетчатки при сочетанном воздействии высокоинтенсивного света и ионизирующей радиации [Потапов А.В., 1998; Дробатулина Д.А., 2004]. Эффекты комбинированного воздействия света и ионизирующей радиации на слезные органы и роговицу мало изучены. Это послужило поводом для проведения настоящего исследования.

Цель исследования:

Изучить морфологические изменения слезного аппарата и роговицы глаза при комбинированном воздействии ионизирующего излучения и высокоинтенсивного света.

Задачи исследования:

1. Изучить характер и динамику морфологических изменений в эпителии и строме слезных желез, начальных отделах слезоотводящего аппарата при световом и комбинированном воздействии.
2. Изучить морфологические изменения сосудов и нервных элементов слезного аппарата при световом и комбинированном воздействии.
3. Изучить влияние светового и комбинированного воздействия на структуру роговицы.
4. Выявить эффект комбинации указанных факторов на слезный аппарат глаза и роговицу.

Научная новизна:

Впервые изучены морфологические изменения, развивающиеся в слезопroduцирующей и начальных отделах слезоотводящей системы глаза, а также в роговице при воздействии видимого света высокой интенсивности и при комбинации указанного фактора с предварительным ионизирующим облучением. Проведен количественный анализ реактивных и деструктивных изменений железистых клеток, эпителия роговицы, нервного аппарата слезных желез. Выявлена неодинаковая реакция разных типов желез при указанных видах воздействия. Обнаружено, что наиболее поражаемыми структурами при действии света являются glanduloциты слезных желез Гардера. В орбитальных и экзоорбитальных слезных железах увеличивается ploидность лакримацитов, которая при комбинированном воздействии носит более выраженный характер, чем при одном световом. Установлено, что при комбинации повреждающих факторов в первую очередь появляются изменения в переднем эпителии роговицы и эпителии начальных отделов слезоотводящего аппарата. Выявлен синергизм рентгеновского излучения и света при воздействии на изучаемые структуры в поздние сроки (7-30 сут).

Практическая значимость работы. Полученные в результате настоящего исследования данные полнее раскрывают морфологическую картину повреждений, возникающих в слезных органах и роговице глаза под действием света и при его комбинации с рентгеновским облучением, и могут представлять интерес для радиобиологов, офтальмологов, патофизиологов. Материалы диссертации используются в учебном процессе при чтении

лекций на кафедре гистологии, эмбриологии и цитологии, кафедре морфологии с курсом общей патологии ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В ранний период после светового и комбинированного воздействия возникает реактивное усиление секреции слезных желез. Позднее (7-30 сут) секреторная активность снижается за счет деструктивных изменений железистых клеток.
2. Эпителий начальных отделов слезоотводящего аппарата при световом и комбинированном воздействии характеризуется наличием реактивных изменений (прикраевая конденсация хроматина в ядрах эпителиоцитов базального слоя), которые затем сменяются деструктивными явлениями (кариопикноз и гидропическая дистрофия эпителиоцитов всех слоев).
3. Реактивные изменения сосудов (нарушение микроциркуляции, пролиферация эндотелия, периваскулярный отек и фиброз) и нервных элементов (дисхромия, варикозные утолщения и истончения, натечки нейроплазмы) слезного аппарата, более выраженные при комбинированном воздействии, играют важную роль в механизмах повреждения слезных желез.
4. Изменения в роговице после комбинированного воздействия ионизирующей радиации и света характеризуются снижением митотической активности переднего эпителия в ранний период (1 сут), а позднее появлением патологических форм митоза, увеличением ядер эпителиоцитов, подверженных пикнозу. При комбинированном воздействии изменяются свойства основного вещества, приводящие к нарушению трофики роговицы, ее неоваскуляризации.
5. При комбинированном воздействии ионизирующей радиации и света на 7-30 сут выявляется синергизм указанных факторов по выраженности фиброзных изменений стромы и сосудов слезных желез, деструктивных изменений ядер железистых клеток, эпителиоцитов роговицы, нарушений свойств основного вещества роговицы.

Апробация. Материалы диссертации доложены на Российской научной конференции морфологов, посвященной 150-летию со дня рождения А.С. Догеля (Томск, 2002); VI международном конгрессе ассоциации морфологов (Санкт-Петербург, 2002); научной конференции, посвященной 70-летию профессора В.Г. Николаева (Красноярск, 2005).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, из них 1 в центральной печати.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 157 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 1 таблицей, 89 рисунками (62 микрофотографии, 10 электронограмм, 16 графиков и 1 схема). Библиографический указатель включает 237 источников, из них 122 на русском и 115 на иностранном языках. Все материалы, представленные в диссертации, получены, обработаны и проанализированы лично автором.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на 100 беспородных белых крысах-самцах, с первоначальной массой 180-200 г, полученных из вивария ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава. Проведены две серии экспериментов, в которых животные были подвергнуты воздействию различных физических факторов. В первой серии экспериментальных животных (n=40) облучали светом высокой интенсивности с помощью люминесцентных ламп ЛБ 40, с максимумом излучения в фиолетовой и зеленой областях спектра. Для облучения использовали специальную установку из прямоугольных рефлекторов, равномерно освещающих клетку с животными с 5 сторон. Освещенность животных составила 3500 лк, расстояние от источника света до поверхности кожи спины равно 50 см. Забой производили через 1, 7, 14 и 30 сут от начала воздействия. Во второй серии эксперимента животных (n=40) подвергали комбинированному воздействию светового и рентгеновского излучений. На начальном этапе крыс однократно тотально облучали рентгеновскими лучами в дозе 5 Гр на аппарате РУМ-17. Условия облучения: фокусное расстояние 40 см, фильтр 0,5 мм Cu, напряжение 180 кВ, мощность дозы 0,64 Гр/мин. После облучения животных содержали в условиях аналогичных первой серии. Забор материала проводили на 1, 7, 14 и 30 сут от начала комбинированного воздействия.

Контрольную группу (n=20), представленную интактными белыми крысами, содержали в условиях естественного освещения (12 ч день, 12 ч ночь, с интенсивностью дневного освещения 25 лк).

Всех животных содержали на обычном пищевом рационе. Эксперименты проводили в осенне-зимний период для исключения сезонных колебаний [Лоскутов З.Ф., 1980]. Умерщвление животных осуществляли декапитацией без применения наркотизирующих средств в строго определенное время суток (10-12 часов). Забой экспериментальных животных производили одновременно с контрольной группой в различные сроки опыта для учета возможных временных изменений. Работа с экспериментальными животными проводилась в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1987 г.) и Федеральным законом РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 г.

Объектами исследования во всех случаях являлись слезные орбитальные и экзоорбитальные железы, железы Гардера, слезные точки, начальные отделы слезных канальцев и роговица. Изучение полученного материала проводили с помощью гистологических, гистохимических, иммуногистохимических и электронно-микроскопических методов.

Сразу же после умерщвления животных производили забор материала и его фиксацию, которую осуществляли в 12% нейтральном формалине, жидкости Карнуа и 2,5% глутаровом альдегиде, забуференном на 0,2 М какодилатном буфере (pH=7,2) при температуре 4° С по Sabatini D.D., Bensch K., Barnett R.J. (1963).

Объекты, фиксированные в жидкости Карнуа, заливали в парафин. После приготовления срезов толщиной 4-6 мкм, проводили окрашивание:

- 1) гематоксилином и эозином;
- 2) гематоксилином и пикрофуксином по Ван-Гизону - для выявления соединительной ткани;
- 3) Шифф-йодной кислотой по J. Mc Manus [Меркулов Г.В., 1968] - для выявления гликогена и нейтральных гликопротеидов;
- 4) 1%-ным водным раствором альцианового синего (рН=1,0; 2,5) по Steedman [Лилли Р.Д., 1950] - для выявления гликозаминогликанов.

Материал, фиксированный в 12% нейтральном формалине, использовали для нейрогистологического исследования и выявления липидов. Срезы слезных желез, толщиной 30-50 мкм, изготовленные на замораживающем микротоме, а также цельную роговицу импрегнировали по Бильшовскому-Гросс в модификации А.И.Рыжова (1960).

Срезы слезных желез Гардера, также изготовленные на замораживающем микротоме, для выявления липидов окрашивали суданом черным В по L. Lison [Луппа Х., 1980].

С целью проведения иммуногистохимического исследования материал фиксировали в 12% нейтральном формалине в течение 24 часов [Эллиниди В.Н. и др., 2002]. Далее объекты заливались в парафин как обычно. На парафиновых срезах проводили двухэтапные реакции для выявления белков-маркеров апоптоза – p53 и bcl-2. На первом этапе депарафинированные срезы подвергали предварительной высокотемпературной обработке с целью демаскировки антигена, а затем инкубации с первыми (специфичными) антителами в течение ночи при температуре +4° С. На втором этапе проводили инкубацию со вторыми антителами, авидин-биотин-пероксидазным комплексом с последующим выявлением пероксидазы хрена диаминобензидином. Готовые срезы докрашивали квасцовым гематоксилином и заключали в канадский бальзам.

Для выявления ДНК и подсчета плоидности ядер готовили мазки-отпечатки экзоорбитальных слезных желез, которые фиксировали в смеси равных частей абсолютного спирта и эфира, затем окрашивали по Feulgen-Rossenbecka [Меркулов Г.В., 1968].

Материал, фиксированный в 2,5% глутаровом альдегиде, постфиксировали в 1% растворе четырехоксида осмия, дегидратировали в спиртах и заливали в эпон. Приготовленные на ультратоме LKB-4 полутонкие срезы окрашивали толуидиновым синим. Ультратонкие срезы помещали на медную сетку, контрастировали цитратом свинца [Reynolds E.S., 1963]. Просмотр и фотографирование полутонких срезов производили на световом микроскопе «МБИ-6», ультратонких – на электронном микроскопе JEM-7A.

Морфометрический анализ

Количественные исследования в слезных железах производили на срезах толщиной 4-6 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином и по Ван-

Гизону. С помощью окулярной сетки Автандилова определяли эпителио-стромальный коэффициент. Для этого вычисляли соотношение количества точек, приходящихся на клетки железистого эпителия, к числу точек, приходящихся на элементы стромы. Используемое увеличение – об. 40^x , ок. 12^x , дополнительное увеличение микроскопа $1,5^x$.

Подсчитывали количество ядер с деструктивными изменениями (пикноз, рексис, лизис) на 1000 ядер железистых клеток.

С помощью цифровой фотокамеры OLYMPUS C-310 ZOOM, имеющей разрешение 2048x1536 пикселей, фотографировали срезы слезных желез, окрашенные гематоксилином и эозином. Для проведения анализа предварительно производили съемку масштабной линейки (в нашем случае объект-микрометра) для последующего получения результатов в реальных единицах измерения (мкм). Используемое увеличение – об. 40^x , ок. 15^x , дополнительное увеличение микроскопа $1,5^x$. На полученных фотографиях с помощью компьютерной программы Photoshop 7,0 определяли площадь и объем ядер.

Мазки-отпечатки слезных желез, окрашенные по Фельгену, фотографировали и на полученных фотографиях, с помощью компьютерной программы Photoshop 7,0, определяли уровень оптической плотности ядер лакримацитов как косвенный показатель диффузности/конденсированности хроматина, который использовали для подсчета плоидности (n) лакримацитов [Шилов Б.В., 2001; Ильинских И.Н., 2002]. Полученные данные сопоставляли с эуплоидным эталоном клеток гонад.

На импрегнированных азотнокислым серебром срезах слезных желез, а также цельных роговицах подсчитывали процентное содержание реактивно и деструктивно измененных, а также неизмененных нервных волокон.

Статистическую обработку данных проводили при помощи компьютерной программы Statistica 6,0. Материалы морфоколичественных исследований обрабатывали по правилам непараметрической статистики с использованием критерия Манна-Уитни. Достоверность различия между контрольными и экспериментальными показателями принимали при $p < 0,05$. Результаты количественного анализа изображали в виде графиков.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологические изменения слезного аппарата глаза и роговицы при световом и комбинированном воздействии

Орбитальные и экзоорбитальные слезные железы

Через 1 сут светового и комбинированного воздействия в цитоплазме лакримацитов накапливаются значительных размеров гранулы белкового секрета, при этом выведение секрета более выражено при воздействии света. При световом облучении в цитоплазме лакримацитов появляются небольшие липидные вакуоли, которые в норме не синтезируются орбитальными и

экзоорбитальными железами. Наряду с морфологической картиной, характеризующей усиление функциональной активности железистых клеток, ультрамикроскопически при световом и комбинированном воздействии выявляются изменения деструктивного характера в виде набухания митохондрий и деструкции их крист. Ядра лакримацитов при указанных видах воздействия обычного размера, единичные из них более крупные, иногда встречаются двуядерные клетки. Электронно-микроскопически геометрия ядерной мембраны нередко характеризуется неровными контурами с выростами в цитоплазму или, напротив, инвагинацией цитоплазмы в ядро, что является приспособительной реакцией клеток с целью увеличения поверхности ядерно-цитоплазматических контактов [Бродский В.Я., Урываева И.В., 1988; Анисимов А.П., 1995].

На 7-е сут светового и комбинированного облучения достоверно ($p < 0,05$) возрастает содержание деструктивно измененных (пикноз, рексис, лизис) ядер лакримацитов орбитальных и экзоорбитальных слезных желез, количество которых при комбинации факторов в 1,6 выше, чем при действии одного света. Вместе с тем увеличивается плоидность клеток, которая также более выражена при комбинированном облучении ($p < 0,05$), составляя $10,68 \pm 1,85$ n, против $5,48 \pm 1,06$ n при световом воздействии (контроль $2,36 \pm 0,32$ n). Внутридольковые выводные протоки содержат небольшое количество секрета. Отдельные клетки выстилающего протоки эпителия после комбинированного воздействия отличаются более крупными, по сравнению с таковыми в контроле, как бы «вздутыми» ядрами.

Через 14 сут воздействия светом часть лакримацитов орбитальных и экзоорбитальных слезных желез мало изменена по сравнению с таковой в предыдущие сроки. На фоне увеличения плоидности продолжает нарастать количество деструктивно измененных ядер. Наряду с концевыми отделами, характерными для орбитальной слезной железы, выявляются ацинусы, типичные для железы Гардера. Данный феномен описан в литературе и по сути является компенсаторно-приспособительной реакцией [Логвинов С.В. и др., 1985; Couhard M. et al., 1974]. Через 14 сут комбинированного воздействия плоидность клеток выше, чем при световом облучении, при этом деструктивные изменения уменьшаются. Отдельные крупные полиплоидные ядра содержат в кариоплазме «вакуоли», выявляемые при электронной микроскопии как инвагинация цитоплазмы в ядро. Иммуногистохимически в 2,81% клеток выявляется очаговая реакция на bcl-2, что может свидетельствовать о супрессии апоптоза в клетках под действием ионизирующей радиации [Reed J.C., 1994]. Междольковые выводные протоки нередко спавшиеся, внутридольковые расширены, содержат небольшое количество белкового секрета.

После 30 сут светового воздействия количество полиплоидных клеток сохраняется на прежнем уровне, при этом деструкции подвержены $10,11 \pm 1,91\%$ ядер. Комбинированное воздействие ионизирующей радиации и света через 30 сут, напротив, приводит к снижению показателя плоидности

до $5,34 \pm 1,41$ п, количество же деструктивно измененных ядер достоверно не отличается от значений предыдущего срока. Внутридольковые и междольковые выводные протоки пусты или содержат следы секрета.

Слезные железы Гардера

Через 1 сут воздействия светом структурные изменения в железах Гардера выражены неравномерно. Часть концевых отделов содержит glanduloциты высокопризматической формы, которые своими апикальными частями почти полностью закрывают просвет концевого отдела. Цитоплазма таких железистых клеток мелкоячеистая, содержит большое количество липидных вакуолей. В то же время, большинство концевых отделов значительно расширены, заполнены секретом, содержащим бурый пигмент – протопорфирин, который выявляется также в просвете выводных протоков. На периферии желез Гардера обнаруживаются единичные участки некроза концевых отделов, представленные бесструктурными эозинофильными фрагментами, окруженными тонкими прослойками межоточной соединительной ткани. Иммуногистохимическое окрашивание выявляет очаговую активность bcl-2 в цитоплазме 2,92% glanduloцитов, реакция на маркер апоптоза p53 отрицательна. Через 1 сут комбинированного воздействия железистый эпителий также характеризуется накоплением значительного количества липидного секрета в цитоплазме glanduloцитов. Ранние ультраструктурные изменения glanduloцитов при световом и комбинированном воздействиях характеризуются набуханием митохондрий, деструкцией их крист. В ядрах части glanduloцитов отмечается расширение перинуклеарного пространства. Иммуногистохимическое исследование на наличие белков p53 и bcl-2 не выявило отличий от контроля.

На 7-е сут светового воздействия бóльшая часть glanduloцитов содержит в цитоплазме липидные включения, которые выявляются и в просвете ацинусов. В то же время, появляются значительно расширенные концевые отделы с уплощенным железистым эпителием, в просвете которых имеется небольшое количество секрета, разрушенные остатки ядерного вещества или целые ядра, а также крупные гранулы протопорфирина, нередко целиком выполняющие просвет ацинуса или выводного протока. При комбинированном воздействии бóльшая часть glanduloцитов сохраняет призматическую форму, накапливая в цитоплазме липидный секрет. В единичных ацинусах встречаются небольших размеров глыбки протопорфирина. Деструктивные изменения ядер glanduloцитов более выражены при световом облучении, в 6,9 раз превышая контрольные значения и в 1,3 раза аналогичные показатели при комбинации факторов ($p < 0,05$).

После 14 сут светового воздействия бóльшая часть концевых отделов желез Гардера представлена уплощенным железистым эпителием, в просвете определяется скудный секрет, фрагменты ядер, значительных размеров гранулы протопорфирина. Через 14 сут комбинированного воздействия значительное число glanduloцитов содержит умеренное количество

липидного секрета, при этом встречаются ацинусы, просвет которых выполнен липидными каплями. В выводных протоках железы Гардера умеренное или небольшое содержание секрета, не встречается протопорфирин.

На 30-е сут воздействия светом в железе Гардера более выражены деструктивные изменения, чем при комбинации указанных факторов. При световом облучении большинство ацинусов имеют значительный просвет за счет резко уплощенной формы glanduloцитов, нередко концевые отделы представлены лишь базальной мембраной, а их эпителий вместе с ядрами слущен в просвет, что свидетельствует в пользу секреции по голокриновому типу и не противоречит литературным данным [Djeridane Y., 1992; Vassari G.C., 2004]. В выводных протоках определяются клетки слущенного железистого эпителия, фрагменты разрушенных ядер, небольшое количество протопорфирина. При световом воздействии число ядер glanduloцитов, подверженных деструкции достоверно выше, чем при комбинированном и составляет соответственно $10,01 \pm 2,6\%$ (контроль $1,95 \pm 0,8\%$) и $7,3 \pm 3,7\%$ (контроль $1,61 \pm 0,4\%$). При комбинированном воздействии многие концевые отделы сохраняют призматическую форму. Пигмент протопорфирин не определяется. Выводные протоки нередко кистозно расширены, эпителий их местами резко истончен, с вытянутыми, уплощенными ядрами. Просветы выводных протоков содержат следы секрета или пусты.

Слезотводящий аппарат

Морфологическая картина начальных отделов слезотводящего аппарата через 1 сут светового воздействия существенно не отличается от таковой в контрольной группе. Слезные точки, начальные отделы слезных канальцев выстланы многослойным плоским неороговевающим эпителием без признаков повреждения. Через 1 сут комбинированного воздействия в ядрах базального слоя эпителия слезотводящих путей отмечается прикраевая конденсация хроматина. В просвете канальцев при всех видах воздействия обнаруживается большое количество отделяемого.

После 7 сут светового облучения эпителий слезотводящих путей характеризуется конденсацией хроматина в ядрах эпителиоцитов всех слоев. В указанные сроки при действии ионизирующего излучения и света во всех слоях эпителия слезных точек и канальцев появляются признаки гидропической дистрофии. Количество отделяемого, содержащегося в просвете, при воздействии указанных факторов умеренное.

На 14-е сут освещения отмечаются признаки гидропической дистрофии отдельных клеток базального слоя эпителия. В единичных эпителиоцитах имеет место кариопикноз. 14-е сут комбинированного облучения характеризуются изменениями, аналогичными таковым в предыдущие сроки, однако, обнаруживается некоторое увеличение митотической активности в эпителиоцитах базального слоя эпителия слезных точек и канальцев.

На 30-е сут при световом воздействии изменения в эпителии мало отличаются от описанных выше, при комбинированном отмечается

кариопикноз клеток базального и шиповатого слоев. В просвете слезных точек и слезоотводящих канальцев после 14-30 сут светового и комбинированного воздействий секрет в основном отсутствует.

Строма и сосуды слезных желез и слезоотводящего аппарата

Морфологические изменения, развивающиеся в строме и сосудах слезных желез и слезоотводящего аппарата, неспецифичны и носят универсальный характер. В ранние сроки (1-7 сут) светового и комбинированного воздействия появляются признаки острого венозного застоя с выраженным отеком внутри- и междольковой стромы слезных желез, а также соединительнотканной основы слезных точек и начальных отделов слезных канальцев. Аналогичные результаты получены в экспериментальных исследованиях влияния ионизирующей радиации на орган зрения животных [Логвинов С.В., 1984; Молчанюк Н.И., Думброва Н.Е., 2002].

Объемные соотношения эпителия и стромы в различных типах желез изменяются по-разному, что связано с отличиями в характере и типе секреции. Так, в орбитальных и экзоорбитальных слезных железах через 1 сут светового облучения, вследствие усиленного синтеза и накопления секрета в лакримацитах, нарастает объем железистой ткани, что приводит к увеличению ЭСК в 1,25 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Комбинированное облучение с 1-х сут вызывает снижение ЭСК до $1,47 \pm 0,05$ (контроль $1,79 \pm 0,03$), которое сохраняется вплоть до 30-х сут воздействия. В слезной железе Гардера отек и последующая пролиферация соединительнотканых элементов стромы и сосудов вызывает достоверное уменьшение ЭСК на 1-30-е сут действия указанных факторов по сравнению с контролем. При этом освещение вызывает в 1,25-1,75 раз ($p < 0,05$) более выраженное снижение данного показателя, чем при комбинированном облучении, что связано также с уменьшением объема железистой ткани.

В более поздние сроки (14-30 сут) при комбинированном воздействии ионизирующей радиации и света уменьшается отек тканей, прогрессирует пролиферация элементов соединительной ткани, объемные соотношения эпителия и стромы изменяются в пользу последней.

Во все сроки светового и комбинированного воздействий сосуды венозного типа расширены, полнокровны, с явлениями эритро- и лейкостаза. В артериальных сосудах количество форменных элементов небольшое. После 14-30 сут при обоих видах воздействия развивается периваскулярный фиброз вокруг артериол. Предварительное комбинированное воздействие в те же сроки приводит к пролиферации клеток эндотелия, что значительно уменьшает просвет части сосудов. Данные реакции не являются специфическими и описаны при действии ионизирующей радиации из различных источников [Любимова Н.В. и др., 1989; Куклина О.И., Страдина М.С., 1990; Думброва Н.Е. и др., 2002; Hopewell J. W., 1988; Fajardo L.F., 1989].

Роговица

Через одни сутки светового воздействия передний эпителий характеризуется слабо выраженной прикраевой конденсацией хроматина в ядрах клеток базального и шиповатого слоев, несколько возрастает количество пикнотично измененных ядер эпителиоцитов. Основное вещество роговицы не изменяет своей структуры, однако, обнаруживается слабый отек вокруг фибробластоподобных клеток. Задний эпителий представлен одним слоем полигональных клеток, не отличается от такового в контрольной группе. При комбинированном воздействии в те же сроки большинство эпителиоцитов роговицы остаются неизменными, единичные клетки шиповатого слоя подвергаются гидропической дистрофии либо кариопикнозу. Ультрамикроскопически отмечается расширение перинуклеарного пространства в эпителиоцитах, а также увеличение количества органелл в цитоплазме. Кроме того, обращает на себя внимание снижение частоты встречаемости митозов в 8,07 раз ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, а также увеличение количества деструктивно измененных ядер до $3,33 \pm 0,09\%$ (контроль $0,49 \pm 0,13\%$). Снижение митотической активности переднего эпителия в роговице под действием ионизирующей радиации описано многими авторами [Белов А.Д., 1999; Мальцев Э.В. и др., 2000]. Основное вещество характеризуется более низким содержанием нейтральных гликопротеинов по сравнению с контролем, о чем свидетельствует слабое окрашивание при постановке ШИК-реакции. В фибробластоподобных клетках основного вещества выявляются признаки деструкции органелл.

На 7-е сут светового воздействия повышается митотическая активность эпителиоцитов базального слоя до $1,073 \pm 0,04\%$ (контроль $0,79 \pm 0,08\%$). Количество клеток переднего эпителия, подверженных деструкции, составляет $0,82 \pm 0,04\%$ (контроль $0,49 \pm 0,09\%$) и остается неизменным вплоть до 30-х сут освещения. После 7-и сут комбинированного воздействия заметно увеличивается митотическая активность в ядрах эпителиоцитов базального слоя ($1,4 \pm 0,03\%$), при этом митозы нередко являются патологическими. Несколько увеличивается количество клеток шиповатого слоя, подверженных гидропической дистрофии. Основное вещество при действии указанных факторов сохраняет строение аналогичное таковому на предыдущем сроке. Задний эпителий остается интактным к световому и комбинированному воздействию.

После 14-и сут светового облучения в переднем эпителии роговицы число митозов продолжает нарастать. В строме собственного вещества отмечается слабый стромальный отек, более выраженный у лимба. По сравнению с контролем, основное вещество слабее окрашивается фуксином, что связано со снижением количества нейтральных гликопротеинов. 14-е сут комбинированного воздействия характеризуются максимальным количеством деструктивно измененных ядер эпителиоцитов, которое в 14,2 раза ($p < 0,05$) превышает контрольные значения. Количество митозов в переднем эпителии роговицы снижается до $1,96 \pm 0,06\%$ и сохраняется на

данном уровне до 30-х сут воздействия. Отмечается перинуклеарный отек в клетках всех слоев переднего эпителия. Собственное вещество роговицы слабо воспринимает фуксин, при этом интенсивно окрашивается альциановым синим (рН 1,0), что свидетельствует о повышенном содержании сульфатированных гликозаминогликанов. В наружных слоях собственного вещества роговицы выражен перичеселлюлярный отек, появляются единичные новообразованные сосуды. Подобное явление, по мнению авторов, свидетельствует о конъюнктивализации роговицы, возникающей под действием ионизирующей радиации [Зацепин Д.И., 1959; Fujishima H., Shiazaki J., Tsubora K., 1996]. Задний эпителий при указанных видах воздействий не проявляет признаков повреждения.

Через 30 сут светового воздействия собственное вещество роговицы характеризуется снижением количества нейтральных гликопротеинов по сравнению с контролем, при этом содержание сульфатированных гликозаминогликанов остается повышенным. Изменений со стороны заднего эпителия на световом уровне не выявлено. Через 30 сут комбинированного воздействия уменьшается количества ядер, подверженных пикнозу. Собственное вещество со слабо выраженным отеком в подлежащих переднему эпителию слоях, слабо воспринимает альциановый синий (рН 1,0), фуксин, что косвенно указывает на снижение в нем сульфатированных гликозаминогликанов и нейтральных гликопротеинов. Единичные клетки заднего эпителия при комбинированном воздействии подвергаются гидропической дистрофии. Задняя пограничная мембрана обычного строения.

Во все сроки передняя и задняя пограничные мембраны остаются устойчивыми к воздействию указанных факторов. Количество слоев в переднем эпителии роговицы во все сроки светового и комбинированного воздействий остается постоянным, и при сравнении с контролем достоверных отличий не выявлено.

Нервный аппарат слезных желез и роговицы

Изменения свободных нервных окончаний, располагающихся по ходу сосудов, в междольковой строме слезных желез и в роговице характеризуются нарастающими реактивными изменениями с 1-х сут светового и комбинированного воздействия. Нервные элементы проявляют повышенную способность к восприятию солей серебра, нередко имеют повышенно извитой ход, часть волокон приобретает варикозные утолщения, сменяющиеся истончениями, выявляются наплывы нейроплазмы. Подобные изменения неспецифичны и наблюдались в экспериментах при воздействии на глаза и слезные органы рентгеновского излучения, микроволн, ультрафиолетовых лучей [Логвинов С.В., 1984; Гусова Б. А., Хорьков А. Д., 1989]. В более поздние сроки (14-30 сут) комбинированного облучения к имеющимся изменениям присоединяются признаки деструкции отдельных нервных волокон и окончаний в виде фрагментации и глыбчатого распада осевых цилиндров.

Реактивные изменения (дисхромия, варикозные утолщения и истончения, натёки нейроплазмы) свободных нервных окончаний слезных желез через 1 сут после светового облучения выявляются в 1,35%, что достоверно не отличается от контроля (контроль 1,21%, $p < 0,05$), и сохраняются на таком уровне до конца эксперимента. При комбинированном воздействии количество реактивно измененных нервных проводников достоверно нарастает к 14-30 сут и в 1,4-1,9 раз превышает контрольные показатели. Процент реактивно измененных нервных волокон роговицы нарастает с $14,31 \pm 0,72\%$ в 1-ые сут светового воздействия до $83,38 \pm 0,19\%$ через 30 сут (контроль $3,52 \pm 0,23\%$, $p < 0,05$). При комбинированном воздействии данный показатель остается достоверно высоким по сравнению с контролем во все сроки, при этом, с 1-ых по 14-е сут воздействия реактивные изменения преобладают в группе с комбинированным облучением, а через 30 сут – со световым.

Деструктивные изменения в нервных волокнах слезных желез при световом и комбинированном воздействиях не отличаются от контрольных показателей ($p < 0,05$). При комбинированном воздействии отмечается некоторая тенденция к нарастанию указанного показателя через 30 сут по сравнению с таковым в контроле и при световом воздействии.

Количество деструктивно измененных нервных окончаний роговицы возрастает на 14-30 сут комбинированного воздействия и составляет соответственно 5,45-7,48%, достоверно отличается от аналогичных показателей в контроле и при световой экспозиции.

В целом, полученные нами изменения позволяют представить схему патоморфогенеза слезного аппарата и роговицы глаза при комбинированном воздействии ионизирующей радиации и света (рис. 1).

Комбинированное воздействие ионизирующей радиации и света вызывает наиболее ранние реактивные изменения в нервных элементах и сосудах слезного аппарата, что не противоречит литературным данным, касающимся влияния радиации на различные органы [Давыдов Г.А., Ушаков И.Б., 1987; Абдрахманов А.А. и др., 1989; Логвинов С.В., 1984, 1993, 1994; Бушуева Н.Н., Думброва Н.Е., 1996; Молчанюк Н.И., Думброва Н.Е., 2002; Логвинов С.В. и др., 2004; Hopewell J. W., 1988; Katon N. et al., 1989; Krebs W. et al., 1990; Chattopadhyay D.N. et al., 1991]. В ответ на раздражение свободных нервных окончаний роговицы, которые в ранний период (1 сут) характеризуются реактивными изменениями (дисхромией, повышенной извитостью, появлением по ходу волокон варикозных утолщений, сменяющихся истончениями, наплывами нейроплазмы), значительно усиливается слезоотделение. Одновременно с этим развиваются аналогичные реактивные сдвиги со стороны интрамурального нервного аппарата слезных органов, а также изменения в сосудах, характеризующиеся выраженным острым венозным полнокровием с явлениями эритро- и лейкостаза, что сопровождается отеком интерстиция слезных желез и подлежащей соединительнотканной стромы начальных отделов слезоотводящего

аппарата. С увеличением времени воздействия (7-30 сут) указанных факторов функциональная активность слезных желез снижается, при этом нарастают деструктивные изменения ядер железистых клеток. Параллельно нарастающим альтеративным изменениям развиваются компенсаторно-приспособительные реакции, проявляющиеся очаговой гиперплазией и увеличением плоидности лакримацитов экзоорбитальных слезных желез. Изменения в сосудах характеризуются пролиферацией эндотелиальных клеток, связанной с предварительным тотальным рентгеновским облучением, что на фоне застойных явлений стимулирует коллагенообразование в периваскулярной, а также внутри- и междольковой строме слезных желез. Данные изменения приводят к значительному утолщению сосудистой стенки и вызывает гипоксию в тканях, которая, как известно, обладает радиозащитным действием. В ответ на комбинированное воздействие в ранний период (1 сут) резко снижается митотическая активность переднего эпителия роговицы, что связано с действием ионизирующего облучения. Через 7 сут появляется большое количество патологических митозов, а к 14-м суткам значительно нарастает содержание ядер эпителиоцитов, подверженных пикнозу. Кроме того, в поздние сроки действия указанных факторов наблюдается изменение состава основного вещества роговицы, что приводит к нарушению ее трофики и последующей неоваскуляризации. Реактивные изменения в свободных нервных окончаниях роговицы через 14-30 сут комбинированного воздействия сменяются признаками деструкции в виде фрагментации и глыбчатого распада осевых цилиндров.

Таким образом, при комбинированном воздействии ионизирующей радиации и света наиболее ранние изменения возникают в интрамуральном нервном аппарате и сосудах слезных желез, что проявляется реактивными признаками в виде дисхромии, натеков нейроплазмы, варикозных утолщений и истончений нервных окончаний, а также нарушением микроциркуляции с развитием отека. Со стороны эпителия слезных желез и роговицы в ранний период (1 сут) отмечается повышенная резистентность к действию указанных факторов. В более поздние сроки эксперимента (7-30 сут) заметен явный синергизм указанных факторов, проявляющийся увеличением деструктивных изменений ядер железистых клеток, нарастанием фиброзных изменений стромы и сосудов слезных желез. Активация компенсаторно-приспособительных процессов приводит к очаговой гиперплазии экзоорбитальных слезных желез, увеличению плоидности лакримацитов. Эпителий начальных отделов слезоотводящего аппарата в ранние сроки (1-7 сут) светового и комбинированного воздействия характеризуется реактивными изменениями в виде прикраевой конденсации хроматина в ядрах эпителиоцитов базального слоя. Позднее (7-30 сут) развиваются деструктивные изменения, проявляющиеся кариопикнозом и гидропической дистрофией эпителиоцитов всех слоев, более выраженные при комбинации факторов. Ранней реакцией роговицы на комбинированное воздействие ионизирующей радиации и света является значительное снижение митотической активности переднего эпителия, чего не наблюдалось при



Рис. 1. Схема патоморфогенеза слезных желез и роговицы при комбинированном воздействии ионизирующей радиации и света

действии яркого света. В поздний период (7-30 сут) появляется большое количество патологических митозов, значительно нарастает содержание ядер эпителиоцитов, подверженных пикнозу, изменяются свойства основного вещества, приводящие к нарушению ее трофики с последующей неоваскуляризацией.

ВЫВОДЫ

1. Предварительное тотальное рентгеновское облучение усиливает повреждающее действие непрерывного интенсивного света на слезные железы, начальные отделы слезоотводящего аппарата и роговицу.
2. Высокоинтенсивное длительное освещение и его комбинация с предварительным воздействием рентгеновского излучения вызывает в ранний период (1 сут) реактивное усиление секреции слезных желез, сменяющееся ее угнетением в более поздние сроки (7-30 сут).
3. Компенсаторно-приспособительные реакции в слезных железах наиболее выражены через 7-14 сут комбинированного воздействия ионизирующей радиации и света, при световом излучении проявляются очаговой гардеризацией, а при комбинированном - увеличением плоидности лакримацитов экзоорбитальных слезных желез.
4. Непрерывное освещение высокой интенсивности и его комбинация с предварительным рентгеновским облучением в ранние сроки (1-7 сут) вызывают реактивные изменения эпителия начальных отделов слезоотводящего аппарата (прикраевая конденсация хроматина в ядрах эпителиоцитов базального слоя), позднее (7-30 сут) сменяющиеся деструктивными нарушениями (кариопикноз, гидропическая дистрофия эпителиоцитов всех слоев). Выявленные реакции менее выражены при одном освещении.
5. Изменения сосудов и стромы слезного аппарата в ранние сроки (1 сут) после светового и комбинированного воздействия носят сходный характер и характеризуются острым венозным полнокровием, выраженным интерстициальным отеком, сменяющимися через 14-30 сут фиброзными нарушениями стромы и сосудов, более выраженными при комбинации факторов.
6. Длительное высокоинтенсивное световое воздействие и его комбинация с предварительным рентгеновским облучением вызывает реактивные сдвиги в интрамуральном нервном аппарате слезных желез (варикозные утолщения, повышенная извитость нервных волокон, наплывы нейроплазмы), наиболее выраженные при комбинированном воздействии.
7. Комбинированное воздействие ионизирующей радиации и света в ранний период (1 сут) вызывает значительное снижение митотической активности, сменяющееся в более поздние сроки (7-14 сут) ее повышением за счет патологических форм; увеличение количества деструктивно измененных ядер эпителиоцитов, изменение свойств основного вещества, приводящее к нарушению трофики роговицы и неоваскуляризации в ней.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Закономерности и тканевые механизмы пострадиационных изменений зрительного анализатора при многофакторных воздействиях / соавт. С.В. Логвинов, И.С. Малиновская, А.В. Потапов, Е.Ю. Варакута, Д.А. Дробатулина, Е.П. Михуля // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической морфологии. – Томск, 2002. – Вып. 2. – С. 46.
2. Изменение структур глаза при световом воздействии / соавт. С.В. Логвинов, А.В. Потапов, Е.Ю. Варакута и др. // Морфология. - 2002. - № 2-3. - С. 128.
3. Морфологические изменения сетчатки при длительном воздействии светом высокой интенсивности / соавт. С.В. Логвинов, Д.А. Дробатулина, А.В. Потапов и др. // Актуальные вопр. эксперим. и клинич. морфологии. - Томск, 2002. - Вып. 2. - С. 35.
4. Морфологические изменения слезной железы Гардера при высокоинтенсивном световом воздействии / соавт. С.В. Логвинов, А.В. Потапов и др. // Актуальные вопр. эксперим. и клинич. морфологии. - Томск, 2002. - Вып. 2. - С. 148.
5. Морфология экзоорбитальных слезных желез белых крыс, подвергнутых высокоинтенсивному световому воздействию / соавт. С.В. Логвинов, Д.А. Дробатулина // Актуальные пробл. медицины и биологии. – Томск, 2003. - Вып. 2. - С. 115-116.
6. Изменения эпителио-стромальных соотношений в слезных железах Гардера при световом и комбинированном воздействии // Актуальные пробл. морфологии. - Красноярск, 2005. - С. 158-159.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

сут - сутки

лк - люкс

Гр - Грей

ЭСК - эпителио-стромальный коэффициент