

Потапов Алексей Валерьевич

ОБЩИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ И ТКАНЕВЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПОРАЖЕНИЯ
СЕТЧАТКИ И ЗРИТЕЛЬНОГО НЕРВА ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ
ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ И СВЕТА

(экспериментальное исследование)

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

14.00.16 –патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Томск – 2006

Работа выполнена в ГОУ ВПО Сибирском государственном медицинском университете Росздрава

Научные консультант:

доктор медицинских наук, профессор Логвинов Сергей Валентинович

Научный консультант:

заслуженный деятель науки РФ,

академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор Новицкий Вячеслав Викторович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор Суходоло Ирина Владимировна

доктор медицинских наук, профессор Склянов Юрий Иванович

доктор медицинских наук, профессор Агафонов Владимир Иванович

Ведущая организация ГО НЦ клинической и экспериментальной медицины СО РАМН, г. Новосибирск

Защита диссертации состоится “_____” _____ 2006 г. в _____ час на заседании диссертационного совета Д 208.096.03 при Сибирском государственном медицинском университете по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

С диссертацией можно ознакомиться в научно – медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (634050, г. Томск, пр. Ленина, 107)

Автореферат разослан “_____” _____ 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Герасимов А.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

АКТУАЛЬНОСТЬ. Внедряемые в различные отрасли науки, производства и медицины искусственные источники света (дуговые прожекторы, ртутно-кварцевые лампы, электро- и газосварочные аппараты, медицинские лазерные скальпели, офтальмокоагуляторы) нередко служат причиной повреждений зрительных функций человека [Power W. J. et al., 1991; Orzalesi N., 1993; Arafat A. F. et al., 1994; Bradham M. S. et al., 1995; Meyer-Rochow V. B., 2000; Rodriguez-Sains Rene, 2001; Uhlig C. E., Gerding H., 2004; Dawson D. G. et al., 2005]. Повреждения сетчатой оболочки глаза человека наблюдаются при применении в клинике офтальмоскопической техники и операционных микроскопов [Bradham M. S. et al., 1995; Kohnen S., 2000; Kleinmann G. et al., 2002; Michael R., Wegener A., 2004]. Клинические исследования показали, что высокоинтенсивный свет может служить фактором внешней среды, ускоряющим возрастные болезни и дистрофию сетчатой оболочки глаза [Wenzel A. et al., 2001]. На сегодняшний день накоплена значительная информация, касающаяся клинико-эпидемиологических и функциональных нарушений зрительного анализатора при воздействии ионизирующей радиации и света.

В реальной действительности организм часто подвергается многофакторному воздействию. Возможность комбинированного поражения органа зрения светом и ионизирующей радиацией не исключается в случае применения ядерного оружия, в условиях космического пилотирования и особенно, как показала авария на Чернобыльской АЭС, при чрезвычайных ситуациях в атомной промышленности [Деваев А. С., 1981; Гуськова А. К. и др., 1987; Умовист Н. М. и др., 1991; Василенко И. Я., 1993; Котелянская К.Е., 2000; Demirchoglian G.G., 2002].

В доступной литературе отражено повреждающее действие света различной интенсивности на компоненты гематоретинального барьера и нейросенсорные клетки. Пороговые альтеративные изменения нейросенсорных клеток (НСК) и пигментоэпителиоцитов сетчатки крыс возникают при воздействии света интенсивностью в 65-130 лк [Willams R. A. et al., 1985; Rowland S. L., Dawson W. W., 1987]. В настоящее время нет единой точки зрения на то, что поражается светом в первую очередь: НСК или пигментоэпителиоциты. По одним данным, первоначальные деструктивные процессы затрагивают пигментный эпителий и лишь затем НСК [Ando H., Noell W. K., 1993; Kozaki J. et al., 1994; Masuda K., Watanabe I., 2000]. Другие исследователи наблюдали первые изменения в НСК, варьирующие от дозы облучения [Unoki K. et al., 1994; Wang H. M. et al., 1994; Koutz R. et al., 1995; Walsh N. et al., 2001].

Работы, в которых анализируются морфологические изменения всех или большинства разновидностей структурных элементов сетчатки после светового облучения, единичны [Егорова Э. В. и др., 1988; Черкасов И. С. и др., 1988]. Крайне мало сведений о реакции на световое облучение ассоциативных и ганглионарных нейронов сетчатки, межнейронных синапсов и зрительного

нерва. Мало внимания уделено количественной оценке изменений различных видов нейронов и синапсов сетчатой оболочки при световом облучении. Не полностью выяснена роль глиальной популяции и сосудистых элементов в эффектах поражения сетчатки светом. В литературе не удалось встретить данных, касающихся гистологических изменений сетчатой оболочки глаза и зрительного нерва при комбинированном воздействии ионизирующей радиации и света.

После различных воздействий в сетчатой оболочке глаза наряду с деструктивными нарушениями активизируются восстановительно-приспособительные процессы. Однако сведений о характере и темпах репарации в нейронах сетчатки, межнейронных синапсах, глиальной популяции, сосудистых элементах и зрительном нерве после комбинированного облучения недостаточно. Информация о деструкции и репарации перечисленных структур необходима для выяснения тканевых механизмов повреждений периферической части зрительного анализатора при световом и комбинированном воздействиях.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Установить общие закономерности повреждения и репарации сетчатки и зрительного нерва при комбинированном воздействии ионизирующей радиации и света, выявить вклад изменений нейрональных, глиальных, сосудисто-барьерных элементов в тканевые механизмы повреждающего действия указанных факторов.

В СООТВЕТСТВИИ С ПОСТАВЛЕННОЙ ЦЕЛЬЮ В РАБОТЕ РЕШАЛИСЬ СЛЕДУЮЩИЕ ЗАДАЧИ.

1. Установить характер и динамику изменений нейрональной популяции сетчатки при воздействии ионизирующей радиации, света различных интенсивностей и комбинированном облучении.
2. Выявить ультраструктурные изменения синапсов сетчатки при воздействии указанных факторов.
3. Описать реакцию глиальных элементов сетчатки при воздействии указанных факторов.
4. Определить характер изменения сосудов и гематоретинального барьера при воздействии указанных факторов.
5. Охарактеризовать изменения зрительного нерва при воздействии указанных факторов.
6. Установить совокупность и последовательность структурных реакций клеточно-тканевых элементов сетчатки и зрительного нерва для выяснения их роли в механизмах поражения и репарации при воздействии указанных факторов.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА. С помощью гистологических, электронно-микроскопических, количественных морфометрических методов впервые проведено исследование реакции всех структурных элементов сетчатки и зрительного нерва как единой функциональной системы на световое (200, 3500 лк), ионизирующее излучения (5, 10, 15 Гр) и их комбинацию. Показано, что ионизирующая радиация и свет вызывают зависящие от дозы, интенсивности и

времени облучения деструктивные и репаративные изменения структурных компонентов сетчатки и зрительного нерва. Выявлено, что наиболее чувствительными компонентами сетчатки к изучаемым воздействиям являются НСК, об этом свидетельствует увеличение процента деструктивно измененных ядер, уменьшение количества рядов и численной плотности ядер в наружном ядерном слое после светового (200, 3500 лк) и комбинированного (5 Гр, 200, 3500 лк) воздействий.

Проведенный количественный анализ изменений нейронов внутренних слоев и радиальной глии показал, что в ранние сроки светового и комбинированных облучений (1-7 сут) отмечается увеличение числа гиперхромных без признаков сморщивания клеточных форм данных клеток, что, по-видимому, свидетельствует об активации процессов репарации в сетчатке. При увеличении срока воздействия параллельно этому наблюдается повышение содержания деструктивных форм ассоциативных и ганглионарных нейронов. В сетчатке также наблюдается повреждение синаптического аппарата, уменьшение численной плотности и общей длины активных зон контактов, приводящие к разобщению межнейронных связей. Деструктивные изменения более выражены после комбинации факторов. Радиальная глия отграничивает участки сетчатки с массовой гибелью НСК пластинчатыми мембранами.

В последующих механизмах поражения структурных компонентов сетчатки важную роль играют деструктивные изменения радиальных глиоцитов, приводящие к нарушениям нейрально-глиальных взаимоотношений и дегенерации зрительного нерва. Репарация синаптоархитектоники, идущая в поздние сроки эксперимента, неполная и осуществляется за счет неосинаптогенеза, созревания и гипертрофии синапсов. Сосудистые изменения (тромбоз, облитерация, сужение просвета и снижение удельной площади срезов открытых хориокапилляров) приводят к нарушению кровообращения и играют важную роль в процессах дегенерации сетчатки.

Изучаемые факторы вызывают очаговые демиелинизирующие изменения зрительного нерва. Выявлено, что миелиновые оболочки более чувствительны к данным факторам, чем осевые цилиндры. Проведенный количественный анализ позволил построить математическую модель повреждений и предложить схему патоморфогенеза структурных элементов сетчатки после воздействия изучаемых факторов.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ РАБОТЫ. Представленные в диссертации данные о дозовой и временной зависимости деструктивных изменений сетчатки глаза при воздействии света и ионизирующей радиации существенно расширяют фундаментальные представления о механизмах межклеточных взаимодействий, диапазоне пластичности тканевых элементов органа зрения и представляют интерес для нейроморфологов и радиобиологов. Новые знания о закономерностях пострадиационного и светового поражения сетчатки и зрительного нерва имеют теоретическое и практическое значение в разработке

средств индивидуальной защиты на производствах, где работающие могут подвергаться воздействию рентгеновского и светового излучений.

Результаты исследования помогут разработать новые стандарты безопасности для офтальмологических приборов, широко используемых для диагностики и лечения глазных заболеваний, и пересмотреть некоторые светотехнические нормы для здоровых людей, профессиональная деятельность которых связана с длительной работой при повышенной освещенности. Предложенные математические модели позволят прогнозировать степень повреждения компонентов сетчатки световым и комбинированным излучениями.

Материалы диссертации используются в учебном процессе при чтении лекций на кафедрах гистологии, эмбриологии и цитологии, морфологии с курсом общей патологии СибГМУ по разделу “Органы чувств”. Работа выполнена в соответствии с планом проблемной комиссии Межведомственного научного совета при Президиуме РАМН “Структурно-функциональные основы организации мозга в норме и патологии”.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Комбинированное воздействие рентгеновского излучения (5, 10, 15 Гр) и света (200, 3500 лк) в ранний период эксперимента (1, 2 сут) проявляет синергизм по выраженности структурных изменений сетчатки глаза. В поздние сроки (7-30 сут) опыта синергические эффекты нивелируются, а по некоторым критериям альтеративное влияние света ослабевает.

2. Наиболее чувствительными структурными компонентами сетчатки к рентгеновскому излучению (5, 10, 15 Гр), световому (200, 3500 лк) и комбинированному воздействиям являются НСК. Ионизирующая радиация вызывает реактивные и деструктивные изменения НСК, степень проявления которых зависит от величины дозы облучения. Световое и комбинированное воздействия вызывают прогрессирующее снижение популяции, численной плотности и числа рядов ядер указанных клеток, сужение, а при использовании высокоинтенсивного света (3500 лк) и очаговое выпадение соответствующих слоев сетчатки. Нейроны внутренних слоев сетчатки проявляют относительную резистентность к изучаемым воздействиям по сравнению с НСК.

3. Реакция радиальной глии при воздействии ионизирующей радиации (5, 10, 15 Гр) света (200, 3500 лк) и комбинации данных факторов в ранний период эксперимента (1, 2 сут) характеризуется фагоцитозом деструктивно измененных НСК, гипертрофией и разрастанием глиальных отростков в субретинальном пространстве. В поздние сроки (7-30 сут) деструктивные изменения затрагивают ядродержащие части глиоцитов, что вызывает их гибель и пролиферацию сохранившейся глии.

4. Изменение хориоидальных и интравитреальных сосудов, нарушение гематоретинального барьера являются основными звеньями в тканевых механизмах повреждения сетчатки при воздействии ионизирующей радиации в разных дозах, света различной интенсивности и комбинации данных факторов. Процессы неоваскулогенеза, активизирующиеся в отдаленные сроки

эксперимента с высокоинтенсивным (3500 лк) световым и комбинированным воздействием, вызывают вторичные деструктивные изменения НСК.

5. Рентгеновское излучение (5, 10, 15 Гр), световое (200, 3500 лк) и комбинированное воздействия вызывают деструктивные изменения зрительного нерва, выраженность которых зависит от дозы облучения, времени и интенсивности воздействия. Миелиновые оболочки более чувствительны к изучаемым факторам по сравнению с осевыми цилиндрами.

АПРОБАЦИЯ. Материалы диссертации доложены на Третьем конгрессе с международным участием «Паллиативная медицина и реабилитация в здравоохранении» (Анталья, 2000); Российской конференции «Организм и окружающая среда, жизнеобеспечение и защита человека в экстремальных условиях» (М., 2000); XXXV юбилейной межвузовской научной конференции «Актуальные проблемы теоретической, экспериментальной и клинической медицины» (Тюмень, 2001); 1-й Всероссийской научной конференции с участием зарубежных специалистов «Актуальные проблемы эволюционной и популяционной физиологии человека» (Тюмень, 2001); Проблемной комиссии «Морфология» 53.03. Новосибирского отделения Всероссийского общества анатомов, гистологов и эмбриологов (2001); Российской научной конференции морфологов, посвященной 150-летию со дня рождения А.С. Догеля (Томск, 2002); VI Международном конгрессе ассоциации морфологов (Санкт–Петербург, 2002); VIII Международном конгрессе ассоциации морфологов (Казань, 2004); IX Итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежь и медицинская наука в XXI веке» (Киров, 2005); IXX Научном совещании гистологов «Актуальные проблемы учения о тканях» (Санкт–Петербург, 2006).

ПУБЛИКАЦИИ. По теме диссертации опубликовано 34 работы, из них 11 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ для опубликования основных результатов диссертации на соискание ученой степени доктора наук.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 4 глав результатов собственных исследований, обсуждения и выводов. Работа изложена на 363 страницах и иллюстрирована 17 таблицами, 121 рисунком (18 микрофотографий, 79 электронограмм, 55 графиков и 1 схема). Библиографический указатель включает 366 источников, из них 135 на русском и 231 на иностранном языке.

СОБСТВЕННЫЕ НАБЛЮДЕНИЯ

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 300 беспородных белых крысах обоего пола с первоначальной массой 170-200 г, полученных из вивариев СГМУ и НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН.

До начала эксперимента крыс выдерживали на протяжении двухнедельного карантинного срока в условиях вивария с учетом традиционных требований к содержанию экспериментальных животных на обычном пищевом рационе. Для того чтобы исключить влияние сезонных

колебаний, основные эксперименты были проведены в осенне-зимний период. Облученных и контрольных животных содержали в идентичных условиях вивария.

Световой режим поддерживали искусственно (12 ч день, 12 ч ночь, интенсивность дневного освещения была равна 25 лк). Надо отметить, что нами первоначально в качестве контроля были взяты сетчатки крыс, находящихся на световом режиме 200 лк (12 ч день, 12 ч ночь) в соответствии с требованиями ГОСТ П-А971 к нормам искусственного освещения помещений. Однако уже при этой интенсивности света были получены альтеративные изменения НСК по критерию кариопикноза, достигающие 2%. Поэтому нами в дальнейшем был использован контроль со световой интенсивностью 25 лк. В этом случае кариопикноз НСК составил 0,2%.

При проведении экспериментов крыс облучали люминесцентными лампами ЛБ-40 с максимумом излучения в желтой и зеленой областях спектра. Для облучения была сконструирована специальная установка из прямоугольных рефлекторов с вмонтированными в них лампами, равномерно освещающими животных с пяти сторон. Для измерения освещенности применяли объективный люксметр. Используемая методика измерений соответствовала ГОСТ 26824-86 и СанПиН 2.2.2.542-96.

Тотальное однократное рентгеновское облучение осуществляли при помощи аппарата РУМ-17. Условия облучения: фокусное расстояние 40 см, фильтр 0,5 мм Си, напряжение 180 кВ, мощность дозы 0,64 Гр/мин. После облучения в динамике определяли общее количество лейкоцитов и эритроцитов в периферической крови. Изменения периферической крови и результаты вскрытия свидетельствовали о развитии острой формы лучевой болезни.

Для оценки характера, степени и последовательности повреждений различных компонентов сетчатки и зрительного нерва были проведены с 1 по 4 серии экспериментов, в которых проводилось постоянное низкоинтенсивное (200 лк) и высокоинтенсивное (3500 лк) освещение животных в течении 1, 2, 7, 14, 30 сут (1-я и 2-я серии), а также освещение на фоне предварительного рентгеновского облучения с интервалом в 1 час (3-я и 4-я серии) (табл. 1). Для оценки степени повреждения и темпов репарационных процессов в изучаемых структурах выполнены с 5 по 11 серии экспериментов. Серии экспериментов 2, 4, 5 выполнены совместно с к.м.н. Д. А. Дробатулиной.

Взятие материала в сериях с 1-й по 4-ю и в 6-й, 7-й, 10-й, 11-й осуществлялось через 30 мин после окончания облучения, в 5-й, 8-й и 9-й сериях - через 30 мин после окончания облучения и через 1, 30, 180 сут после экспериментальных воздействий. Взятие материала в эксперименте осуществляли после умерщвления животных декапитацией. Объектами исследования являлись сетчатки и зрительные нервы. В контрольную группу входили 85 необлученных крыс, которые содержались в аналогичных условиях с экспериментальными.

График опытов планировался таким образом, что забой одной или нескольких групп облученных животных производился одновременно с

Таблица 1.

Распределение животных по сериям экспериментов

№ серии	Воздействие	Животные (n)	Время исследования
1	Постоянное облучение светом интенсивностью 200 лк	Белые крысы – 25	1, 2, 7, 14, 30 сут
2	Постоянное облучение светом интенсивностью 3500 лк	Белые крысы - 25	1, 2, 7, 14, 30 сут
3	Рентгеновское облучение 5 Гр + свет 200 лк	Белые крысы - 25	1, 2, 7, 14, 30 сут
4	Рентгеновское облучение 5 Гр + свет 3500 лк	Белые крысы - 25	1, 2, 7, 14, 30 сут
5	Однократное тотальное рентгеновское облучение в дозе 5 Гр	Белые крысы – 25	30 мин, 1, 30, 180 сут
6	Однократное тотальное рентгеновское облучение в дозе 10 Гр	Белые крысы - 10	30 мин
7	Однократное тотальное рентгеновское облучение в дозе 15 Гр	Белые крысы - 10	30 мин
8	Облучение светом 3500 лк в течение 48 ч	Белые крысы - 25	30 мин, 1, 30, 180 сут
9	Рентгеновское облучение 5 Гр + свет (48 ч, 3500 лк)	Белые крысы - 25	30 мин, 1, 30, 180 сут
10	Рентгеновское облучение 10 Гр + свет (48 ч, 3500 лк)	Белые крысы - 10	30 мин
11	Рентгеновское облучение 15 Гр + свет (48 ч, 3500 лк)	Белые крысы - 10	30 мин

контрольной группой в строго фиксированное время дня (в 10-12 ч) с учетом известных суточных вариаций зрительных структур. Эксперименты проводили с соблюдением приказа Министерства здравоохранения СССР за № 755 от 12.08.77 об обеспечении принципов гуманного обращения с животными и федеральным законом РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997.

Микроскопическое исследование на светооптическом уровне

Глазные яблоки фиксировали в жидкости Карнуа, 12% нейтральном формалине и заливали в парафин. Отвесные срезы задней стенки глаза окрашивали гематоксилином и эозином, крезоловым фиолетовым по Нисслю для выявления хроматофильного вещества в перикарионах нейронов.

Электронномикроскопическое исследование

Для ультрамикроскопических исследований центральные и периферические участки сетчатки и зрительные нервы фиксировали погружением и перфузией. Для этого использовали 2,5% раствор глутаральдегида, разведенный для перфузии 0,2 М фосфатным, а для погружной фиксации какодилатным буферами (рН 7,4). Необходимо отметить, что из-за небольшой толщины сетчатки метод перфузии не давал явных преимуществ, и нами в работе в основном была использована фиксация погружением. Исследуемый материал постфиксировали в 2% растворе четырехоксида осмия на холоду, дегидратировали в спиртах восходящей концентрации, заливали в аралдит и эпон.

На осмированных препаратах плохо выявляются филаментозные парамембранные образования, поэтому для количественного изучения синаптического пула на этапе дегидратации без предварительного осмирования сетчатки контрастировали в 5% растворе фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК) на абсолютном спирте в течение 3 ч. ФВК, взаимодействуя с белками микрофиламентов системы субсинаптических единиц (ССЕ), приводит к значительному возрастанию электронной плотности последних, что и позволяет проводить количественный анализ синаптической популяции.

На ультратоме LKB-4 (Швеция) готовили полутонкие и ультратонкие срезы. Просмотр и фотографирование полутонких срезов, окрашенных толуидиновым синим, производили на световом микроскопе "Люмам II". Ультратонкие серебристые и бледно-золотистые срезы помещали на медные сетки. Осмированные препараты докрашивали уранилацетатом и цитратом свинца [Reynolds E. S., 1963] и изучали в электронных микроскопах JEM -7 А и JEM - 100 CX – II (Япония).

Морфо - стереометрический анализ

Стереометрически на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином с помощью окулярной измерительной сетки Автандилова, определяли удельную толщину слоев и площадь очагов поражения сетчатки. Для подсчета использовали метод наложения точечных сеток на срезы с последующим подсчетом числа совпадений точек с профилями исследуемых структур. Доля

точек, попавших на структурные профили (P_{pi}), оценивает их относительный объем ($V_{(vi)}$).

$$V_{(vi)} = P_{pi} = P_i / P_t$$

Где P_i - число точек, выпавших на слой или очаг поражения, а P_t - число точек занимаемых, сетчаткой [Автандилов Г. Г. и др., 1990].

На поперечных срезах сетчатки толщиной 5-7 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином, подсчитывали количество НСК, ассоциативных и ганглионарных нейронов в поле зрения, определяли их соотношение. На полутонких срезах, окрашенных толуидиновым синим, производили подсчет НСК с деструкцией (пикноз, рексис, лизис) ядра на 1000 клеток с каждой сетчатки. Определяли удельную площадь открытых капилляров хориоидеи, толщину пигментного эпителия, количество слоев и численную плотность (в мм² среза) ядер в наружном ядерном слое. Вычисляли процент гиперхромных и пикноморфных радиальных глиоцитов, нейронов внутреннего ядерного и ганглиозного слоев, содержание мультиполярных нейронов с очаговым и тотальным хроматолизом на 200 клеток с каждой сетчатки. Подсчет клеток производили в окулярной рамке на площади 900 мкм² с 5 срезов с каждой сетчатки при увеличении 10 x 90.

В зрительном нерве под электронным микроскопом подсчитывали содержание дегенеративно измененных осевых цилиндров и процент нервных проводников с явлениями очаговой демиелинизации.

Для оценки изменений синаптоархитектоники фотографировали по 15 случайно выбранных полей зрения внутреннего сетчатого слоя с 5 срезов каждой сетчатки при стандартном увеличении 8500. При конечном увеличении 30000, полученном с помощью фотоувеличителя, определяли количество межнейронных контактов (площадь поля зрения 50 мкм²) и высчитывали численную плотность синапсов на 100 мкм² нейропиля.

Выявленные на электронограммах ФВК-позитивные контакты в зависимости от плоскости среза подразделяли на ряд категорий. Анализировали только определенные синаптические контакты, в которых четко были видны все элементы ССЕ: электронноплотный материал пресинаптической зоны, синаптической щели и постсинаптической части. В плоскость среза контактов неопределенного вида попадала только часть ССЕ. Подсчитывали количество определенных контактов с асимметричной и симметричной организацией ССЕ. Для асимметричных контактов характерно дискретное расположение ФВК-позитивного материала пресинаптической зоны в виде плотных проекций (ПП) пресинаптической решетки, а в симметричных контактах электронноплотный материал пресинаптической зоны не организован в отдельные филаментозные образования.

Асимметричные контакты, в свою очередь, по степени выраженности ПП дифференцировали на типы А, В, С [Семченко В. В., Степанов С. С., 1987]. В контактах типа А высота ПП была больше 60 нм, в контактах типа В соответствовала 50-60 нм, типа С меньше 50 нм. Длину активной зоны контакта (АЗК), которая на ФВК-контрастированном материале соответствовала всему

синаптическому профилю, определяли с помощью тестовой решетки с шагом 3 мм. По протяженности АЗК все контакты делили на очень мелкие (< 100 нм), мелкие (100 - 200 нм), малые (200 - 300 нм), средние (300 - 500 нм), крупные (500 - 700 нм) и очень крупные (> 700 нм). Подсчитывали численную плотность плоских, положительно «+» и отрицательно «-» искривленных синапсов [Семченко В. В., Степанов С. С., 1995].

Цифровой материал обработан общепринятыми методами вариационной статистики [Автандилов Г. Г и др., 1990]. Использовались методы статистического описания и проверки статистических гипотез [Боровиков В., 2001]. Для каждой выборки вычисляли выборочное среднее, дисперсию, стандартную ошибку выборочного среднего. Статистическая обработка данных была проведена при помощи программы «MINITAB» на компьютере IBM PC AT 806586.

Проверка нормальности выборок проводилась с помощью критерия Колмогорова. При нормальном распределении переменных проверку гипотезы о равенстве выборочных средних выполняли с использованием t-критерия Стьюдента для независимых выборок. В случае отсутствия согласия данных с нормальным распределением для оценки различий между независимыми выборками применяли критерий Манна - Уитни. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Полученные данные обрабатывали методом дисперсионного анализа с использованием программы «Statistic 6.0». По данным экспериментов проводилось построение математической модели изменений при помощи методов, реализованных в программной среде mathCAD (интерполяция, регрессия, аппроксимация).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты настоящего исследования показывают, что наиболее поражаемыми структурами сетчатки во всех сериях экспериментов являются НСК. При длительном световом воздействии (200, 3500 лк) в первую очередь страдают их наружные сегменты, которые являются первичным участком зрительной трансдукции. Ультраструктурные изменения проявляются пузырьковидной дегенерацией, дезориентацией мембранных дисков и разрывом мембран. Вышеописанные изменения наружных сегментов носят неспецифический характер и обнаружены при воздействии низкочастотного ультразвука, хронической свинцовой интоксикации, под влиянием хлорохина и при дефиците витамина А, при моделировании пролиферативной витреоретинопатии на фоне аллоксанового диабета [Артыгалиева Д. М., 1975; Иванина Т. А., Боровягин В. А., 1988; Афанасьев Ю. И., Никифоров С. А., 1990; Логвинов С. В. и др., 2005].

Деструктивные процессы в наружных сегментах НСК приводят к очаговому выпадению фотосенсорного слоя при длительном световом (3500 лк) и комбинированном (5 Гр, 3500 лк) воздействиях. Обновление дисков

наружных сегментов от базальных к апикальным частям происходит в период темновой адаптации. Но при постоянном световом раздражении рецепторной клетки этот процесс прерывается. По-видимому, с увеличением времени эксперимента происходит нарушение взаимосвязей пигментоэпителиоцитов с наружными сегментами НСК, что приводит к прогрессивному снижению деятельности защитных систем и развитию дегенеративных процессов, начинающихся с периферических отделов клеток.

Репарация наружных сегментов находится в зависимости от состояния и уровня метаболизма внутреннего сегмента НСК [Basinger S. F., Hoffman R. T., 1982; Moria M. et al., 1986]. Выявленные нами изменения внутренних сегментов во всех сериях эксперимента, как правило, сопровождаются деструкцией митохондрий, снижением числа рибосом и полисом эндоплазматической сети во внутренних сегментах. После 1 сут светового облучения (200, 3500 лк) наблюдается просветление матрикса и деструкция крист митохондрий, свидетельствующие об активации их функционального состояния и усилении энергетических затрат. В сериях с комбинированными воздействиями (5, 10, 15 Гр, 200, 3500 лк) мы наблюдали вакуолизацию митохондрий эллипсоидов, некоторые из них имели вид полого мешочка. В митохондриях часто появляются миелиноподобные структуры, развитие которых связано с активацией перекисного окисления липидов мембран. Видимо, непосредственное действие изучаемых факторов приводит к резкому локальному повышению перекисного окисления, которое уже не компенсируется антиперекисной защитой, в результате чего образуются повреждения отдельных мембран с последующей гибелью всей органеллы или группы органелл. Наличие таких деструктивных процессов является своеобразным маркером неадекватного действия изучаемого фактора. Необходимо также отметить, что митохондрии – это основные субклеточные органеллы, активизирующие апоптоз [Zamzami N., et al., 1996; Takahashi A. et al., 2004].

После светового и комбинированного воздействий во всех сериях экспериментов нами обнаружены изменения структуры эндоплазматической сети внутреннего сегмента НСК, которая часто утрачивала часть своих рибосом и фрагментировалась. Из её цистерн образовывались различных размеров вакуоли. На ранних сроках эксперимента изменения развивались лишь локально и в отдельных клетках. Однако если этот процесс не был компенсирован и имел тенденцию к прогрессированию, что наблюдали при длительном световом и комбинированном облучениях, в клетках происходило дальнейшее разрушение рибосом и мембран, приводящее к более выраженному нарушению белоксинтезирующей функции. В таких случаях изменения сопровождались отеком клетки и другими деструктивными явлениями. Подобные изменения свидетельствуют о снижении функциональной способности и угнетении белоксинтезирующей и транспортных систем нейрона [Basinger S. F., Hoffman R. T., 1982; Moria M. et al., 1986].

Основным критерием обратимости нарушений является состояние ядродержащей части клетки. Необходимо отметить, что исследования

последних лет указывают на присутствие двух альтернативных путей гибели клеток сетчатой оболочки глаза: непосредственного некротического повреждения и апоптозной гибели клеток [Conforti E; et al., 2002; Whiteman A. L. et al., 2002; Roca A. et al., 2004]. В настоящее время апоптоз рассматривается как наиболее распространенный тип клеточной смерти и как один из важнейших путей клеточного обмена при дегенерации сетчатки. С некрозом связывают первичное непосредственное повреждение нейронов сетчатки, а также в связи с дисциркуляторными расстройствами вследствие поражения сосудов [Whiteman A. L. et al., 2002].

Морфологически некроз проявляется набуханием клетки и разрывом наружной мембраны с выходом содержимого клетки в межклеточную среду. При апоптозе происходит уменьшение размера клетки, конденсации и фрагментации хроматина, уплотнение наружной и внутренней ядерных мембран. В мембране клетки появляются пузырьки, затем сморщиваются органеллы и цитоплазма, происходит уплотнение хроматина ядра. Вслед за этим начинается фрагментация ДНК с образованием 180-200 частей, что является отличительным признаком апоптоза [Arends M. J. et al., 1990., Mc Conkey D. J. et al., 1996]. Образующиеся в результате этого апоптозные тельца поглощаются соседними клетками без воспаления и повреждения ткани [Adams J. M, Cory S., 1998]. Показано, что воздействие высокоинтенсивного света на сетчатку вызывает некроз колбочковых и апоптоз палочковых НСК [Cortina M. S. et al., 2003].

После окончания рентгеновского облучения в дозе 5 Гр содержание деструктивно измененных ядер НСК возрастает до $3,8 \pm 0,23\%$ (контроль $0,15 \pm 0,02\%$) и значимо не отличается от такового после окончания воздействия рентгеновскими лучами в дозе 10, 15 Гр. Анализ характера изменений численной плотности ядер и толщины наружного ядерного слоя в этих сериях эксперимента свидетельствует о том, что данные показатели также значимо не отличаются друг от друга.

Количество деструктивно измененных ядер НСК после длительного (7, 14, 30 сут) низкоинтенсивного светового воздействия (200 лк) до 14-х сут значимо не отличалось от контрольных значений. После 7-х сут комбинированного облучения (5 Гр, 200 лк) содержание деструктивно измененных ядер НСК значительно превышало соответствующие значения при световом воздействии. После 2-х сут высокоинтенсивного светового облучения (3500 лк) число деструктивно измененных ядер НСК в 2 раза превышает соответствующие значения после окончания воздействия ионизирующей радиации. При комбинированном воздействии (5 Гр, 3500 лк) в этот срок виден явный синергизм по данному показателю, который проявляется в более высоких значениях содержания деструктивно измененных ядер НСК – их число возрастает до 30%.

Анализ изменения слоев, образованных НСК, при длительном (7, 14, 30 сут) световом (3500 лк) и комбинированном (5 Гр, 3500 лк) облучениях, свидетельствует о следующих закономерностях. Во-первых, в слоях,

образованных данными клетками, наблюдаются очаги поражения, при этом их размер зависит от времени воздействия и вида фактора. Так, на 7-е сут светового облучения (3500 лк) на $50 \pm 3,87\%$ длины срезов сетчатки отсутствует фотосенсорный слой, а к 14-м сут деструкции подвергаются практически все наружные и внутренние сегменты НСК. Во-вторых, изменения НСК при световом облучении проявляются более интенсивно, чем при комбинированном. Так, очаговое выпадение фотосенсорного слоя после комбинированного облучения (5 Гр, 3500 лк) наблюдается только на 14 сут эксперимента, когда он на $33,33 \pm 2,21\%$, а на 30 сут на $73 \pm 3,15\%$ длины срезов сетчатки отсутствует. На 30-е сут эксперимента в серии со световым воздействием (3500 лк) погибает 98,6%, а после комбинированного 82% НСК. Вероятней всего, это объясняется тем, что в механизме радиационного повреждения ведущую роль играют нарушения ГРБ, вследствие чего блокируется поступление кислорода в сетчатку, а значит, снижается образование свободных радикалов. Но несмотря на кажущуюся относительную сохранность НСК при комбинированном облучении, большинство клеток наружного ядерного слоя подвержено деструкции, являясь, по сути, погибшими клетками.

На 30-е сут после окончания светового воздействия (2 сут, 3500 лк) наблюдалась очаговая деструкция клеток пигментного эпителия. В результате этого нарушались репарационные процессы в НСК и происходила их массовая гибель. Наружный ядерный слой при этом был представлен единичными ядрами, пространство между которыми заполнено гипертрофированными глиальными отростками. В отдаленные (6 мес) сроки после светового и комбинированного воздействий (2 сут, 5 Гр, 3500 лк) единичные НСК восстанавливают свое нормальное строение. Процент деструктивно измененных ядер НСК снижается по сравнению с таковым в предыдущие сроки за счет утилизации их радиальными глиоцитами и макрофагами. Достоверных различий в содержании деструктивно измененных НСК при сравнении данных воздействий не наблюдается, но их количество в 2 раза превышает контроль ($p < 0,05$).

Ассоциативные нейроны внутреннего ядерного слоя показали относительную резистентность к воздействию изучаемых факторов по сравнению с НСК. При всех использованных видах воздействия наиболее поражаемыми оказались амакринные нейроны, наименее – горизонтальные. В горизонтальных нейронах обнаруживаются преимущественно реактивные изменения, которые проявляются отеком цитоплазмы, набуханием митохондрий и цистерн эндоплазматического ретикулума. Деструктивные нарушения в данных клетках встречаются очень редко даже при воздействии нейтронов в дозе 40,5 Гр [Логвинов С. В., 1998]. Возможно, это связано с особенностями метаболизма и низким содержанием органелл, таких как митохондрии и ЭПС [Давыдов Б. И., 1984]. В части биполярных и особенно амакринных нейронов наблюдается деструкция цитоплазмы и ядра, приводящая к гибели клетки. При этом амакринные нейроны, по нашим

данным, гораздо чаще вовлекаются в деструктивные процессы по сравнению с биполярными.

После изучаемых воздействий в очагах поражения биполярные нейроны можно разделить на два типа: «светлые» и «темные». «Светлые» - имеют отчетные перикарионы, в их цитоплазме наблюдается деструкция митохондрий и гипертрофия комплекса Гольджи. Среди них очень часто встречаются клетки, ядра которых содержат по два и более гипертрофированных ядрышка. «Темные» нейроны характеризуются повышенной базофилией ядра и цитоплазмы и делятся на гиперхромные и пикноморфные. К гиперхромным относятся те, которые характеризуются темным, крупным ядром, уменьшенными размерами, резко базофильной цитоплазмой и наличием в ней большого количества органелл, особенно свободных рибосом. В пикноморфных клетках наблюдается сморщивание ядра и дегенерация органелл, что, по-видимому, является отражением некробиотических процессов [Калимулина Л. Б., 2002]. Поэтому разделение ассоциативных нейронов на группы по функциональному состоянию клеток на гиперхромные, пикноморфные, в совокупности со «светлыми» - становится обоснованным. Это отражает интенсивность компенсаторно-приспособительных реакций нейронов внутреннего ядерного слоя и дегенеративных процессов, протекающих в сетчатке при воздействии изучаемых факторов. Необходимо отметить мнение о том, что гиперхромные нейроны находятся в заторможенном состоянии [Калимулина Л. Б., 2002].

Была проанализирована динамика изменения числа гиперхромных и пикноморфных нейронов внутреннего ядерного слоя. Сразу после окончания воздействия ионизирующей радиации в дозах 5, 10, 15 Гр количество гиперхромных ассоциативных нейронов значительно превышает контрольные значения ($p < 0,05$). После окончания комбинированного облучения (10, 15 Гр, 3500 лк) происходит снижение данного показателя и он становится в 3,5 раза меньше, чем при одном рентгеновском воздействии ($p < 0,05$).

Значимых различий в количестве гиперхромных ассоциативных нейронов после 14, 30 сут светового (200 лк) и комбинированного (5 Гр, 200 лк) облучений не обнаруживалось. Анализ изменения динамики содержания числа гиперхромных нейронов внутреннего ядерного слоя после высокоинтенсивного (3500 лк) светового облучения свидетельствует о прогрессирующем росте данного показателя ($p < 0,05$). После 7 сут комбинированного облучения (5 Гр, 3500 лк) число гиперхромных нейронов возрастает до $15,3 \pm 1,49\%$, (контроль $0,5 \pm 0,13\%$), что в 1,7 раза превышает таковое в серии с одним освещением и достоверно не меняется до 30-х сут воздействия. Необходимо отметить, что гиперхромные клетки локализуются преимущественно на границе с наружным сетчатым слоем и особенно на участках сетчатки с массовой гибелью НСК.

Возможно, что изучаемые воздействия в ранние сроки эксперимента (1-7 сут) усиливают функциональную активность ассоциативных нейронов внутреннего ядерного слоя сетчатки и приводят к активной мобилизации всех имеющихся в ней ультраструктур.

Особое внимание стоит уделить динамике изменения количества пикноморфных ассоциативных нейронов. После окончания рентгеновского облучения в дозе 5, 10 Гр число пикноморфных ассоциативных нейронов значимо не превышает таковое в контроле. После комбинированного воздействия (10 Гр, 3500 лк) их количество достигает $5,82 \pm 0,63\%$ (контроль $1,94 \pm 0,23\%$) и значимо не отличается от соответствующих показателей у крыс после воздействия ионизирующей радиации в дозе 15 Гр и комбинированного воздействия (15 Гр, 3500 лк).

После низкоинтенсивного (200 лк) светового облучения данный показатель значимо не отличается от контрольных значений. После 30 сут комбинированного облучения (5 Гр, 200 лк) число пикноморфных ассоциативных нейронов в 2,2 раза превышает соответствующие значения после воздействия светом, что, по-видимому, свидетельствует об усилении деструктивных процессов в данный период.

После высокоинтенсивного светового облучения (3500 лк) содержание пикноморфных ассоциативных нейронов возрастает к 14-м сут и достигает $5,6 \pm 0,9\%$ на 30-е сут эксперимента. При комбинированном воздействии число пикноморфных нейронов уже на 7-е сут превышает контрольные значения, но в последующие сроки остается ниже соответствующих показателей в аналогичные сроки после одного светового воздействия.

Преобладание числа пикноморфных нейронов при воздействии яркого света (3500 лк) над таковым в серии экспериментов с комбинированным облучением можно объяснить следующими фактами. По литературным данным, жизненный цикл «темных» клеток разделяют на два этапа. Первый характеризуется клеточными изменениями, которые приводят к гиперфункциональному состоянию, описанному выше. Это состояние рассматривают как паранекротический период [Ясвоин Г. В., 1948]. В некоторых случаях происходит дегенерация и исчезновение «темной» клетки, так как в состоянии генетического аппарата, сопоставимом со стрессовой ситуацией, происходит сбой в механизмах регуляции активности генов и начинается их хаотическая экспрессия, приводящая к трансформации клетки и программированной клеточной гибели – апоптозу [Волянский Ю. Л., и др., 1994; Бажанов Е. Д., 1999; Зенков Н. К. и др., 1999; Хорвяков А. В. и др., 2000]. Факторы, способствующие запуску апоптотического ответа, в большей степени активизируются в серии эксперимента с освещением, что и доказывает переход гиперхромных нейронов в пикноморфные клетки в большей степени при воздействии света высокой интенсивности, чем при комбинированном облучении.

Второй период может характеризоваться также выходом из такого состояния «темной» клетки и превращение ее в «светлую». Данный исход в наших исследованиях, скорее всего, проявляется при рентгеновском облучении в дозе 5, 10 Гр, так как дегенеративных нарушений при этих воздействиях достоверно не найдено, а численная популяция нейронов от контрольных значений не отличается.

Появление пикноморфных клеток при рентгеновском (15 Гр), световом (200, 3500 лк) и комбинированных облучениях соответствует периоду срыва компенсаторно-приспособительных механизмов в НСК и активации данных процессов во внутреннем ядерном слое, в особенности на границе с очагами поражения. Чем больше срок, тем выше число гиперхромных без признаков сморщивания нейронов, что подтверждает высокую адаптационную реакцию ассоциативных нейронов на пагубное воздействие изучаемых факторов.

Одним из критериев дегенерации нервной клетки мы считали появление в ней мембранных комплексов. Данные структуры обнаруживались в цитоплазме нейронов на 14 сут светового (200, 3500 лк) и комбинированного (5 Гр, 200, 3500 лк) воздействий и через 1 мес после окончания светового (3500 лк, 2 сут) и комбинированного (5 Гр, 3500 лк, 2 сут) облучений. Происхождение данных структур до конца не выяснено. Одни авторы считают, что они являются продуктами белоксинтетического аппарата клетки либо представляют собой дериваты митохондрий [Moriya M. et al., 1986; Антипов В. В., и др., 1989]. Другие авторы полагают, что их появление связано с перекисным окислением липидов, которое ведет к дезинтеграции биологических мембран и изменению их морфологических свойств. Считают, что данные образования появляются в лизосомах. Подобные структуры наблюдаются при наследственных лизосомальных болезнях, при которых повреждаются ферменты клеточного пищеварения, вследствие чего происходит накопление внутри лизосом различных нерасщепленных субстратов [Иванинина Т. А., Лебедева М. А., 1982]. Большинство авторов считают появление мембранных комплексов следствием деструкции в клетке [Боголепов Н. Н., 1979; Абдрахманов А. А., 1988].

Альтеративные изменения ассоциативных нейронов в отдаленные сроки (6 мес) после светового (3500 лк, 2 сут) и комбинированного (5 Гр, 3500 лк, 2 сут) воздействий приводят их к гибели. Последующий лизис данных клеток ведет к образованию на границе внутреннего ядерного слоя и мембранного комплекса полостей, имеющих значительный объем.

Чувствительность нейронов и их способность воспринимать нервные импульсы не постоянны и меняются под влиянием ряда факторов, среди которых важное место принадлежит структуре межнейральных синапсов [Lukasiewicz P. D., 2005]. Изменение строения одного из компонентов синапсов неизбежно ведет к нарушению синаптической передачи. Высокую повреждаемость синаптического аппарата наряду с НСК определяют основные компоненты их структур. Все синаптические мембраны богаты полиненасыщенными жирными кислотами и повреждаются в результате активации перекисного окисления липидов сильнее, чем мембраны других участков нейронов [Razdan V. et al., 1993]. Синапсы также являются местом наибольшего накопления ионов Ca^{2+} . Воздействие света увеличивает содержание Ca^{2+} в цитоплазме нервной клетки [Edwards D. F. et al., 1991; Li J. et al., 1991, 1993, 1995]. Свободные ионы кальция дестабилизируют синаптическую мембрану и активируют протеолитические ферменты и Ca^{2+} -

зависимую протеинкиназу, блокируют работу энергетических и синтетических систем синапса [Razdan B. et al., 1993; Kristian T. et al., 1994]. К механизмам повреждения синапсов в различных экспериментальных моделях относят также снижение содержания макроэргических соединений, глюкозы, изменения обмена арахидоновой кислоты, снижение рН, нарушение ионного гомеостаза, образование свободных радикалов, активацию перекисного окисления липидов, приводящие к повреждению мембраны и энергозависимых ионных насосов [Семченко В. В. и др., 1995; Степанов С. С. и др., 1995].

После воздействия ионизирующей радиации в дозах 5, 10, 15 Гр в синаптических структурах наблюдается набухание отростков, дезагрегация везикул, отек митохондрий. Наши исследования показали, что низкоинтенсивное световое (200 лк) и комбинированное (5 Гр, 200 лк) воздействия вызывают дегенерацию синаптических контактов в основном по «светлому» типу. Для деструкции по данному типу характерно набухание и просветление нейроплазмы пресинаптического отдела с уменьшением числа синаптических пузырьков [Боголепов Н. Н., 1975]. Сохранившиеся везикулы располагаются вблизи пресинаптической мембраны. После высокоинтенсивного светового (3500 лк) и комбинированного (5 Гр, 3500 лк) воздействий синапсы в основном изменены по «темному» типу. Это проявляется повышением осмиофилии цитоплазмы, уменьшением числа и гиперосмиофилией митохондрий и везикул, утолщением и повышением электронной плотности постсинаптической мембраны. Сходные изменения наблюдаются в синапсах сетчатки после микроволнового воздействия и в синаптических структурах коры больших полушарий после гамма - облучения [Антипов В. В., 1987; Гайдамакин Н. А., Ушаков И. Б., 1988; Логвинов С. В., 1993].

Значимое снижение численной плотности синаптических контактов обнаруживается с помощью ФВК контрастирования уже в ранний период после светового (3500 лк), рентгеновского (5 Гр) и комбинированного (5 Гр, 3500 лк) облучений. Данное явление следует считать результатом деструкции синапсов. С точки зрения функциональной активности существенный интерес представляет соотношение в общем числе синапсов симметричных и асимметричных контактов. Симметричные синаптические связи считаются незрелыми, неактивными. У асимметричных контактов оценивается степень кривизны. Плоские связи относятся к функционально неактивным, «+» изогнутые – к активно функционирующим межнейральным контактам. При этом «+» изогнутые контакты находятся в фазе экзоцитоза везикул [Семченко В. В. и др., 1995]. Так, например, после окончания воздействия ионизирующей радиации в дозе 10, 15 Гр численная плотность синаптических контактов достоверно не отличается от такового в контроле, но в данных сериях эксперимента уменьшается содержание асимметричных синапсов, в основном за счет «+» и «-» изогнутых контактов, что свидетельствует о резком снижении функционально активных межнейронных связей, и как следствие – нарушении синаптической передачи. После окончания комбинированного

облучения ионизирующей радиации в дозе 10, 15 Гр и высокоинтенсивным светом (3500 лк) процессы деструкции синаптического аппарата усиливаются и наблюдается снижение общей численной плотности контактов по сравнению с таковым в сериях с одним рентгеновским облучением. В серии с воздействием 10 Гр + 3500 лк уменьшено число асимметричных плоских, а в серии 15 Гр + 3500 лк – как симметричных, так и асимметричных контактов.

После низкоинтенсивного (200 лк) светового облучения численная плотность синаптических контактов до 30 сут значимо не отличалась от таковой в контроле. После 30 сут светового (200 лк) облучения происходит уменьшение данного показателя также в основном за счет «+» и «-» изогнутых асимметричных контактов. Эффекты комбинированного облучения (5 Гр, 200 лк) появляются в более ранний период (7 сут) и характеризуются почти полным исчезновением плоских асимметричных контактов.

На 7-е сут высокоинтенсивного (3500 лк) светового облучения уменьшение численной плотности синапсов происходит за счет асимметричных контактов, но в данной серии эксперимента деструкции подвержены как плоские, так и «+», «-» изогнутые контакты. После 7 сут комбинированного облучения (5 Гр, 3500 лк) по сравнению с одним световым облучением почти полностью исчезают «+» изогнутые контакты, а после 30 сут уменьшение связей происходит в основном за счет симметричных синапсов.

Высота плотных проекций также отражает функциональное состояние синапса. Снижение высоты плотных проекций и нечеткость контуров свидетельствует о протеолитической деструкции филаментозных образований синапса. Это приводит к нарушению синаптической передачи при нормальной структуре синаптических везикул [Аккерт К., 1972; Степанов С. С., 1986; Семченко В. В. и др., 1995, 1999]. Подобные изменения наблюдаются в ранний и поздний периоды во всех сериях эксперимента и характеризуются резким уменьшением числа контактов с высотой ПП < 50 нм.

Длина активной зоны синапса соответствует определенному состоянию синаптического контакта. В зависимости от функциональных нагрузок нейронов синапс может переходить от одной формы к другой, меняя при этом кривизну и высоту плотных проекций [Carverley R. K. S. et al., 1990]. Такую особенность синаптического аппарата называют пластичностью. Полагают, что реорганизации подвергаются только активные асимметричные контакты. «Синаптическим депо» служат симметричные синапсы, которые под действием определенных факторов преобразуются в асимметричные – функционально активные синапсы. Объединение мелких и средних синаптических связей в формы с удлинённой зоной контакта, наблюдаемое во всех сериях эксперимента, происходит вследствие большой нагрузки и является проявлением компенсаторно-приспособительных реакций. Такие гипертрофированные синапсы существуют определенное время, до срыва адаптационных механизмов, далее распадаются на мелкие, неактивные контакты. В поздний период эксперимента хорошо заметна тенденция созревания средних синапсов из неактивных и гипертрофия сохранившихся,

особенно эти процессы выражены при комбинированных (5 Гр, 200, 3500 лк) облучениях.

В поздние сроки после светового воздействия (3500 лк, 2 сут) активно идут процессы неосинаптогенеза. Новообразование синапсов сопровождается изменением состава межнейронных контактов. Наблюдается достоверное увеличение числа мелких синапсов (высота плотных проекций < 50 нм, длина активной зоны контакта < 100 нм) по сравнению с контролем. Параллельно наблюдается гипертрофия сохранившихся контактов. В поздние сроки после комбинированного воздействия (5 Гр, 3500 лк, 2 сут) отмечается резкое снижение численной плотности всех типов синапсов и длины активной зоны контактов, но одновременно активизируются процессы неосинаптогенеза. Однако увеличение количества и восстановление строения синаптических везикул в отдаленные сроки после светового (3500 лк, 2 сут) и комбинированного (5 Гр, 3500 лк, 2 сут) воздействий свидетельствуют о развитии компенсаторно-приспособительных процессов в межнейронных контактах.

Структурные реакции мультиполярных нейронов ганглионарного слоя после рентгеновского облучения в дозах 5, 10, 15 Гр характеризуются в основном изменением содержания хроматофильного вещества в перикарионах нервных клеток. Гранулярная эндоплазматическая сеть данных нейронов часто утрачивала часть своих рибосом и фрагментировалась, а из ее цистерн образовывались различных размеров вакуоли. Эти явления свидетельствовали о нарушении синтеза белка. На ранних сроках эксперимента изменения развивались лишь локально и в отдельных клетках. Однако при более длительных воздействиях в клетках происходило дальнейшее разрушение рибосом и мембран, приводящее к более выраженному нарушению белоксинтезирующей функции. В таких случаях изменения сопровождались отеком клетки и другими деструктивными явлениями. Увеличение числа хроматолитически измененных нейронов свидетельствует о перенапряжении и истощении этих клеток, вследствие чего наблюдается нарушение синтетических процессов, аксонального транспорта и синаптической передачи [Leo H. et al., 1987; Miller M., 1988].

Изменения мультиполярных нейронов ганглиозного слоя сетчатки характеризуются нарушением содержания хроматофильного вещества. Очаговый хроматолит относится к обратимым изменениям, и наиболее высокие показатели ганглионарных нейронов с таким сдвигом появляются при воздействии на сетчатку ионизирующей радиации в дозе 5 Гр, а также после 2 сут светового (3500 лк) и комбинированного (5 Гр, 3500 лк) облучений.

Тотальный хроматолит относится к необратимым изменениям и ведет в дальнейшем к гибели клетки. Содержание мультиполярных нейронов ганглионарного слоя с тотальным хроматолитом в ранние сроки эксперимента (30 мин, 1 сут) при рентгеновском (5, 10, 15 Гр), световом (200 лк) и комбинированном воздействиях значительно превышает контрольные значения. Наибольшее содержание ганглионарных нейронов с тотальным

хроматолизом 24% при длительном воздействии изучаемых факторов выявляется на 14 сут после светового (3500 лк) и на 7 сут после комбинированного (5 Гр, 3500 лк) воздействий (контроль $1,95 \pm 0,48\%$). На данный период в этих сериях экспериментов по результатам наших исследований во всех слоях сетчатки наблюдается срыв компенсаторных механизмов, но на 30 сут эксперимента происходит снижение данного показателя, что, скорее всего, свидетельствует об утилизации клеток-теней.

Содержание ганглионарных нейронов с гиперхромией ядра и цитоплазмы, так же как и в ассоциативных нейронах, указывает на активное функциональное состояние этих клеток и адаптационные процессы, протекающие в сетчатке при воздействии изучаемых факторов.

Анализ динамики изменений числа гиперхромных нейроцитов ганглионарного слоя свидетельствует о том, что после окончания рентгеновского облучения в дозе 10 Гр их число достигает $10,23 \pm 2,18\%$ (контроль $3,4 \pm 2,83\%$) ($p < 0,05$). После окончания воздействия ионизирующей радиации в дозе 15 Гр данные значения в 1,6 раза больше таковых в серии с облучением в дозе 10 Гр. После окончания комбинированного воздействия (10 Гр, 3500 лк) содержание гиперхромных нейронов ганглионарного слоя в 1,7 раза больше, а при комбинации ионизирующей радиации и высокоинтенсивного света (15 Гр, 3500 лк) в 2 раза меньше, чем в сериях с одним рентгеновским воздействием. Снижение числа данных клеток после комбинированного облучения (15 Гр, 3500 лк) по-видимому свидетельствует об усилении деструктивных процессов в данной серии эксперимента.

После 7 сут комбинированного облучения (5 Гр, 200 лк) и после 2 сут комбинации высокоинтенсивного света и ионизирующей радиации (5, Гр, 3500 лк) число гиперхромных ганглионарных нейронов в 2 - 2,3 раза превышает соответствующие значения в серии со световым воздействием.

Содержание пикноморфных ганглионарных нейронов после окончания рентгеновского облучения (5, 10, 15 Гр) достоверно не отличается от такового в контроле. После 7 сут комбинированного облучения (5 Гр, 200, 3500 лк) число данных клеток максимально и в 1,5 – 3,2 раза превышает соответствующие значения в контроле (контроль $5,23 \pm 1,48\%$).

Состояние зрительного нерва играет важную роль в механизмах фотодегенерации сетчатки. Так, известно, что рассечение зрительного нерва крыс защищает НСК от светового воздействия (24 ч, 1000 лк), а его повреждение приводит к активации микроглии во внутренних слоях сетчатки [Ronald A. B., Theodore P. W., 1991; Salvador-Silva M, et al., 2000]. Изменения зрительного нерва после ионизирующего (5, 10, 15 Гр), светового (200, 3500 лк) и комбинированного воздействий проявляются в основном деструкцией и уменьшением числа органелл и нейротрубочек в осевом цилиндре и демиелинизирующими нарушениями. Очень часто наблюдаются явления фагоцитоза участков миелиновой оболочки осевыми цилиндрами или глиальными элементами. В глиальных клетках и эндотелиоцитах кровеносных капилляров наблюдается набухание митохондрий, расширение цистерн

эндоплазматической сети, умеренная вакуолизация. Данные изменения носят неспецифический характер и были обнаружены в зрительных нервах крыс с пониженным внутриглазным давлением, содержащихся на диете, бедной марганцем, медью [Yoshinori D., Tsugio A. 1991; Huaqing G., Tsugio A. 1999; Sinisa D. G., et al., 2004].

Количественный анализ проводников зрительного нерва с деструктивными изменениями осевого цилиндра, миелиновой оболочки и сочетанными патологиями выявил, что после окончания воздействия ионизирующей радиации в дозах 5 и 10 Гр данные показатели достоверно не отличаются от таковых в контроле. После окончания комбинированного воздействия ионизирующей радиацией в дозе 10 Гр и света (3500 лк) число нервных проводников с дегенеративными изменениями миелиновой оболочки составляет $14,5 \pm 2,13\%$ (контроль $6,2 \pm 0,94\%$), что в 2,3 раза, а содержание с дегенеративными изменениями осевых цилиндров и миелиновой оболочки $8,66 \pm 1,73\%$ (контроль $4,6 \pm 0,92\%$), что в 1,8 раза превышает таковое у крыс получивших изолированное рентгеновское облучение. После окончания воздействия ионизирующей радиации в дозе 15 Гр достоверно (в 1,6 раза по сравнению с таковым при воздействии в дозе 10 Гр) увеличивается количество нервных волокон с очаговой демиелинизацией. Достоверных различий в содержании нервных волокон с дегенеративными изменениями осевых цилиндров и миелиновых оболочек после окончания комбинированного воздействия ионизирующей радиацией (10, 15 Гр) и света выявлено не было.

В ранние сроки (1-7 сут) после светового (200, 3500 лк) и комбинированного (5 Гр, 200, 3500 лк) облучений данные показатели достоверно не отличаются друг от друга в соответствующих сериях эксперимента и характеризуются в основном в значимом повышении количества нервных проводников с явлениями очаговой демиелинизации на 7-е сут эксперимента. На 30-е сут эксперимента наблюдается увеличение содержания нервных волокон с одновременной дегенерацией осевого цилиндра и миелиновой оболочки, более выраженное в серии с высокоинтенсивным световым воздействием.

Необходимо отметить, что деструктивные изменения зрительного нерва во всех сериях эксперимента соответствуют таковым в перикарионах ганглионарных нейронов. Проведенный корреляционный анализ выявил положительную зависимость ($r = 0,54$) между содержанием пикноморфных ганглионарных нейронов на 14-е сут и деструктивными изменениями осевого цилиндра на 30-е сут низкоинтенсивного (200 лк) светового облучения. На 7-е сут комбинированного (5 Гр, 200 лк) воздействия также наблюдается положительная зависимость ($r = 0,55$) между количеством пикноморфных нейронов ганглионарного слоя и числом нервных волокон с явлениями очаговой демиелинизации. Дегенерация ганглионарных нейронов на 14-е сут светового (3500 лк) облучения вызывает увеличение числа нервных волокон с явлениями одновременной дегенерации осевого цилиндра и миелиновой оболочки на 30-е сут эксперимента ($r = 0,82$).

Глия является неотъемлемым элементом нервной ткани, вовлекается во все основные процессы, осуществляемые нейронами, принимая активное участие в процессах повреждения и репарации нервной ткани. Морфологические исследования вскрыли тесную взаимосвязь изменений нейронов и окружающих их глиальных клеток при различных патологических процессах в центральной нервной системе [Александровская М. А. и др., 1965]. Олигодендроглиоциты и астроциты сетчатки во все сроки эксперимента показали сходные по характеру реактивные изменения, проявляющиеся набуханием митохондрий и расширением цистерн эндоплазматического ретикулума. После 30-и сут светового (200, 3500 лк) и комбинированного (5 Гр, 200, 3500 лк) воздействий во внутреннем ядерном слое появляются глиоциты, имеющие неправильную форму ядра с фестончатыми контурами, гомогенным распределением хроматина и высокой электронной плотностью кариоплазмы, а их цитоплазма содержит большое количество различной величины вакуолей и лизосом. Подобное строение позволило предположить, что данные клетки имеют микроглиальную природу. При исследовании крыс с наследственной дистрофией НСК сетчатки отмечалось, что микроглиоциты мигрируют к дегенеративно измененным НСК из внутренних слоев сетчатки [Thanos S., Richter W., 1993].

Наиболее ранние изменения после изучаемых воздействий возникают в тех частях радиальных глиоцитов, которые расположены непосредственно в местах их контакта с НСК, то есть в склеральных отростках. Сначала они подвергаются гипертрофии, а в их цитоплазме появляется большое количество мембранных комплексов. Наши исследования показали, что чем больше очаг поражения НСК, тем выраженнее глиальная пролиферация. Глия окружает погибшие НСК пластинчатыми отростками, ограждая поврежденный участок от сохранившихся компонентов сетчатки.

Деструктивные явления в витреальных отростках проявляются в меньшей степени, так как они находятся в слоях сетчатки, которые меньше всего вовлечены в дегенеративные процессы. Выраженные ультраструктурные изменения в витреальных отростках глиоцитов наблюдали только после светового (3500 лк) и комбинированного воздействий (5, 10, 15 Гр). Дегенерация витреальных отделов объясняет нарушение синтетической функции данных клеток [Harstad H. K., Ringgovold A., 1985; Lewis G. P., 1989].

При воздействии ионизирующего излучения (5 Гр) в ранние сроки число гиперхромных и пикноморфных радиальных глиоцитов не отличается от контрольных значений. При увеличении дозы радиации (10, 15 Гр) количество гиперхромных клеток в 2 раза превышает контрольные значения (контроль $6,4 \pm 2,18\%$). Эффекты комбинированного воздействия (10, 15 Гр, 3500 лк) по данному показателю выражены в большей степени. После 7 сут светового облучения (200 лк) содержание гиперхромных радиальных глиоцитов составляет $9,64 \pm 1,78\%$, что в 1,4 раза превышает соответствующие значения после комбинированного облучения (5 Гр, 200 лк) и достоверно не меняется до 30 сут эксперимента. После комбинированного облучения (5 Гр, 3500 лк) на 2

сут эксперимента содержание данных клеток составляет $22,34 \pm 3,69\%$, что в 1,4 раза превышает таковое при световом облучении и остается на таком уровне и в дальнейшем.

После 7 сут светового облучения (200 лк) число пикноморфных радиальных глиоцитов в 3,6 раза превышает контрольные значения (контроль $3,26 \pm 0,23\%$), но в последующие сроки намечается тенденция к снижению данного показателя, по-видимому, за счет утилизации погибших радиальных глиоцитов функционально активными гиперхромными клетками, и после 30 сут воздействия он значимо не отличается от контрольных значений. После 30 сут комбинированного облучения (5 Гр, 200 лк) данный показатель составляет $15,64 \pm 3,92\%$, что в 4,6 раза больше соответствующих значений после одного светового воздействия. После высокоинтенсивного светового (3500 лк) облучения увеличение числа пикноморфных радиальных глиоцитов наблюдается на 14 сут, а после комбинированного (5 Гр, 3500 лк) на 7 сут эксперимента.

В ранние сроки после комбинированного воздействия (5 Гр, 3500 лк, 2 сут) на участках сетчатки, лишенных НСК вследствие деструкции, наблюдается гипертрофия и усиление фагоцитарной активности радиальных глиоцитов, а в их яросодержащих отделах увеличивается количество деструктивно измененных митохондрий и цистерн эндоплазматической сети, появляются мембранные комплексы. Деструктивные изменения радиальных глиоцитов достигают максимума к 30 сут после окончания комбинированного облучения. При разрушении фоторецепторных слоев в глиоцитах сетчатки увеличивается содержание фибриллярного кислого белка и регистрируется снижение синтеза глутаматсинтетазы вследствие гибели главного производителя глутамата - НСК [Tyler N. K., Burns M. S., 1991; Groshe J. et al., 1995; Harada C., et al., 2003]. Необратимые деструктивные изменения радиальных глиоцитов вызывают снижение репаративных процессов со стороны нейронов сетчатки. Глиальные реакции носят дозовую и временную зависимость, но при рентгеновском облучении они незначительны и обратимы [Логвинов С.В., 1998].

Проведенный корреляционный анализ выявил сильную зависимость между деструктивными изменениями НСК и радиальных глиоцитов после комбинированных (5 Гр, 200, 3500 лк) воздействий. Так, повышение числа пикноморфных глиоцитов на 7-е сут усиливает деструкцию НСК на 14 сут комбинированного воздействия ионизирующей радиации и низкоинтенсивного света ($r = 0,66$), а усиление деструктивных процессов НСК на 7 сут комбинированного воздействия ионизирующей радиации и высокоинтенсивного света приводит к повышению количества погибших глиоцитов на 14 сут ($r = 0,67$). Выявленная корреляционная зависимость исчезает в поздние сроки эксперимента.

Вопрос об изменении гематоретинального барьера представляется особо важным в свете его физиологической роли. После длительного светового (3500 лк) и комбинированного (5 Гр, 3500 лк) воздействий наблюдаются весьма существенные нарушения гематоретинального барьера, в первую очередь на

это указывает то, что в пигментном эпителии отмечаются очаговые дефекты, в которых пигментоэпителиоциты отсутствуют, а ведь именно пигментоэпителиальные клетки и плотные замыкающие контакты между ними являются основным компонентом гематоретинального барьера.

До 7 сут эксперимента сохранность пигментного эпителия, по-видимому, обусловлена его мощными защитными механизмами от воздействия ионизирующей радиации (5 Гр) и света (200, 3500 лк), и его структурные реакции выражаются в активации фагоцитарной функции части эпителиоцитов. Изменения в основном носят реактивный характер: в апикальной части цитоплазмы повышается содержание фагосом, в базальных и центральных отделах выявляются многочисленные вакуоли, уменьшается базальная складчатость. В поздние сроки деструкция НСК ведет к дальнейшему увеличению фагоцитарной активности пигментоэпителиоцитов, их гипертрофии. Известно, что значительная часть гипертрофированных клеток пигментного эпителия в отдаленный период после воздействия возвращается к своему изначальному строению [Bush E. M. et al., 1999].

Наряду с этим в пигментном эпителии развиваются деструктивные изменения, которые проявляются разрушением микроворсинок, отеком органелл и исчезновением базальной складчатости, что приводит к гибели части пигментоэпителиоцитов. Деструкция пигментного эпителия носит очаговый характер, что, вероятно, связано с функциональным неодинаковым исходным состоянием клеток, а также с очаговыми нарушениями хориокапилляров и гематоретинального барьера. Дефекты пигментного эпителия, повреждение структуры плотных межэпителиальных контактов приводят к попаданию в сетчатку путем внеклеточного транспорта крупномолекулярных соединений [Бредбери М., 1983; Антипов В. В. и др., 1989].

Изменения интравитреальных сосудов и хориоидеи после рентгеновского (5 Гр), светового (200 лк) и комбинированного облучений носят неспецифический характер. В ранний период после указанных воздействий эндотелиоциты капилляров характеризуются отеком цитоплазмы и ее вакуолизацией. Подобные эффекты в сосудистых компонентах наблюдались при действии микроволн, гамма и нейтронного облучения [Абдарахманов А. А. и др., 1985; Давыдов Г. А., Ушаков И. Б., 1987; Буймова Н. П., 1993; Логвинов С. В., 1998]. С увеличением дозы ионизирующей радиации (10, 15 Гр) и интенсивности светового воздействия (3500 лк) наблюдается сужение просвета хориокапилляров, стаз и сладж форменных элементов, деструктивные изменения эндотелия. Световое (3500 лк) и комбинированное (5 Гр, 3500 лк) воздействия приводят к уменьшению удельной площади открытых хориокапилляров при увеличении срока облучения. Известно, что гипоксия обладает радиомодифицирующим действием у разных видов животных (мыши, крысы, собаки) при облучении головы в в среднетлетальных дозах ионизирующего излучения, так, снижение кровотока на 60% приводит к 50% радиозащитному эффекту [Ушаков И. Б. 2003].

Необходимо отметить, что в нашем исследовании наблюдалась очаговость поражения хориокапилляров. Резкое снижение удельной площади открытых капилляров хориоидеи происходит, в основном, на участках с массовой гибелью НСК, а на других участках сетчатки отмечается полнокровие этих сосудов. Данные явления способствуют дегенеративным процессам в нейронах сетчатки и срыву компенсаторно-приспособительных реакций.

В отдаленные сроки после светового (3500 лк, 2 сут) и комбинированного (5 Гр, 3500 лк, 2 сут) воздействий в сетчатке отмечаются явления неоваскулогенеза. Основываясь на литературных данных и результатах нашего эксперимента, мы можем выделить следующие стадии неоваскулогенеза в сетчатке после указанных воздействий.

1. Деструктивные изменения хориокапилляров, пигментоэпителиоцитов и НСК.
2. Массовая гибель НСК и как следствие этого исчезновение слоев, ими образованных.
3. Локальные дефекты пигментного эпителия и мембранного комплекса; пролиферация пигментоэпителиоцитов по краям дефектов, гипертрофия и нагромождение их друг на друга.
4. Проращение капилляров между пигментоэпителиоцитами.
5. Проращение капилляров, окруженных пигментным эпителием, во внутренние слои сетчатки.
6. Атрофия и дегенерация пигментного эпителия.
7. Проллиферация глиальных компонентов во внутреннем ядерном слое, их контакт с мембранным комплексом, а в местах его дефектов - с хориокапиллярами.

Вновь образованные сосуды характеризуются повышенным содержанием рибосом и наличием крупного ядра в эндотелиоцитах. Их базальные мембраны тонкие и прерывистые. Новообразующиеся сосуды в местах их контакта с радиальными глиоцитами отличаются наличием нефенестрированного и гипертрофированного эндотелия.

Математическое моделирование применяется в технике и медицине для качественного определения вида различных зависимостей при недостаточном количестве измерений определённого критерия и предполагает построение различного рода моделей, способных описать вид зависимости в неопределённых точках эксперимента. В нашем случае требовалось предсказать, какое количество пикноморфных клеток будет обнаружено в сетчатке в определённый день в период воздействия изучаемыми факторами. Для реализации поставленной цели были взяты данные, полученные в эксперименте.

Математическое моделирование по полученным данным проводилось при помощи методов, реализованных в программной среде mathCAD (интерполяция, регрессия, аппроксимация). Взяв за основу экспериментальные результаты, проводили сплайнинтерполяцию и затем сравнивали результат с аппроксимирующим мультифункциональным выражением, которое изначально

было достаточно сложным, но в процессе вариаций слагаемых были подобраны оптимальные члены, которые при относительной простоте выражения давали бы такое же качественное решение, как и для сложной зависимости самих функций. Изначально выражение выбиралось по принципу сопоставления определенной функции каждому участку кривой, а уже на предпоследнем этапе моделирования эта функция упрощалась.

В результате проведенной работы было показано, что содержание пикноморфных нейронов и радиальной глии сетчатки после воздействия ионизирующей радиации (5 Гр) света (200, 3500 лк) и их комбинации могут быть описаны следующими видами зависимостей:

Для рентгеновского излучения в дозе 5 Гр.

$$f(t) = a_0 t + a_1 t^{\frac{2}{3}} + a_2 t^{\frac{3}{4}} + a_3 e^{-t}$$

Для светового и комбинированного воздействий.

$$f(t) = a_0 t^{\frac{100}{J}} + a_1 t^{\frac{200}{J}} + \frac{J}{200} a_2 t^{\frac{300}{J}} + a_3 e^{-t}$$

$f(t)$ – количество пикноморфных клеток.

J – интенсивность света.

a_i – коэффициенты полученные при моделировании (для соответствующего пула клеток) (таб. 2).

t – время экспериментального воздействия.

Анализ полученных при моделировании кривых показал, что к световым (200, 3500 лк) и комбинированным (5 Гр, 200, 3500 лк) воздействиям наиболее чувствительными являются НСК. Их изменения характеризуются повышением числа поражаемых клеток в ранние сроки эксперимента. Нейроны внутренних слоев сетчатки проявили меньшую чувствительность к действию изучаемых факторов. Реакция радиальной глии на низкоинтенсивное (200 лк) световое воздействие характеризуется повышением числа деструктивно измененных клеток в ранние сроки эксперимента и снижением их содержания при увеличении срока эксперимента. Высокоинтенсивное (3500 лк) световое и комбинированные (5 Гр, 200, 3500 лк) облучения вызывают сходный характер изменений радиальных глиоцитов, которые проявляются повышением числа погибших клеток при увеличении времени воздействия. Необходимо отметить, что полученные статические модели подтверждают экспериментальные данные и удовлетворительно описывают плавное изменение процесса между данными.

Результаты математического моделирования и данные корреляционного анализа позволили предложить следующую схему патоморфогенеза сетчатки при комбинированном воздействии ионизирующей радиации (5 Гр) и света (200, 3500 лк) (рис. 1).

Комбинированное воздействие вызывает изменения элементов сетчатки: нейронов, синапсов, глии и компонентов гематоретинального барьера, степень проявления которых зависит от интенсивности светового воздействия.

Таблица 2

Коэффициенты для пикноморфных клеток, полученные при моделировании

Вид клеток	α_1	α_2	α_3	α_4
	Рентгеновское излучение 5 Гр			
НСК	3,739	-1,317	0,131	0,016
Ассоциативные нейроны	1,876	-0,522	0,045	1,991
Ганглионарные нейроны	4,852	-1,439	0,132	5,066
Радиальная глия	4,194	-1,272	0,121	3,138
	Свет 200 лк			
НСК	1,031	0,021	-0,022	0,554
Ассоциативные нейроны	2,167	-0,26	-0,011	1,756
Ганглионарные нейроны	3,478	-0,687	0,04	5,008
Радиальная глия	8,42	-2,235	0,146	2,959
	Рентгеновское излучение + Свет 200 лк			
НСК	1,306	0,282	-0,071	-0,105
Ассоциативные нейроны	2,365	-0,732	0,08	1,8
Ганглионарные нейроны	1,909	2,295	-0,446	4,658
Радиальная глия	1,108	-1,857	-0,221	5,072
	Свет 3500 лк			
НСК	4,91	-0,943	0,055	0,474
Ассоциативные нейроны	323,569	-648,791	17,657	1,928
Ганглионарные нейроны	6,065	-2,31	0,294	5,102
Радиальная глия	2,087	0,014	-0,034	3,411
	Рентгеновское излучение + свет 3500 лк			
НСК	22,441	-7,229	0,825	-2,534
Ассоциативные нейроны	2,229	-0,439	0,027	1,853
Ганглионарные нейроны	2,855	-0,069	-0,037	5,108
Радиальная глия	2,4	-0,709	0,14	4,627

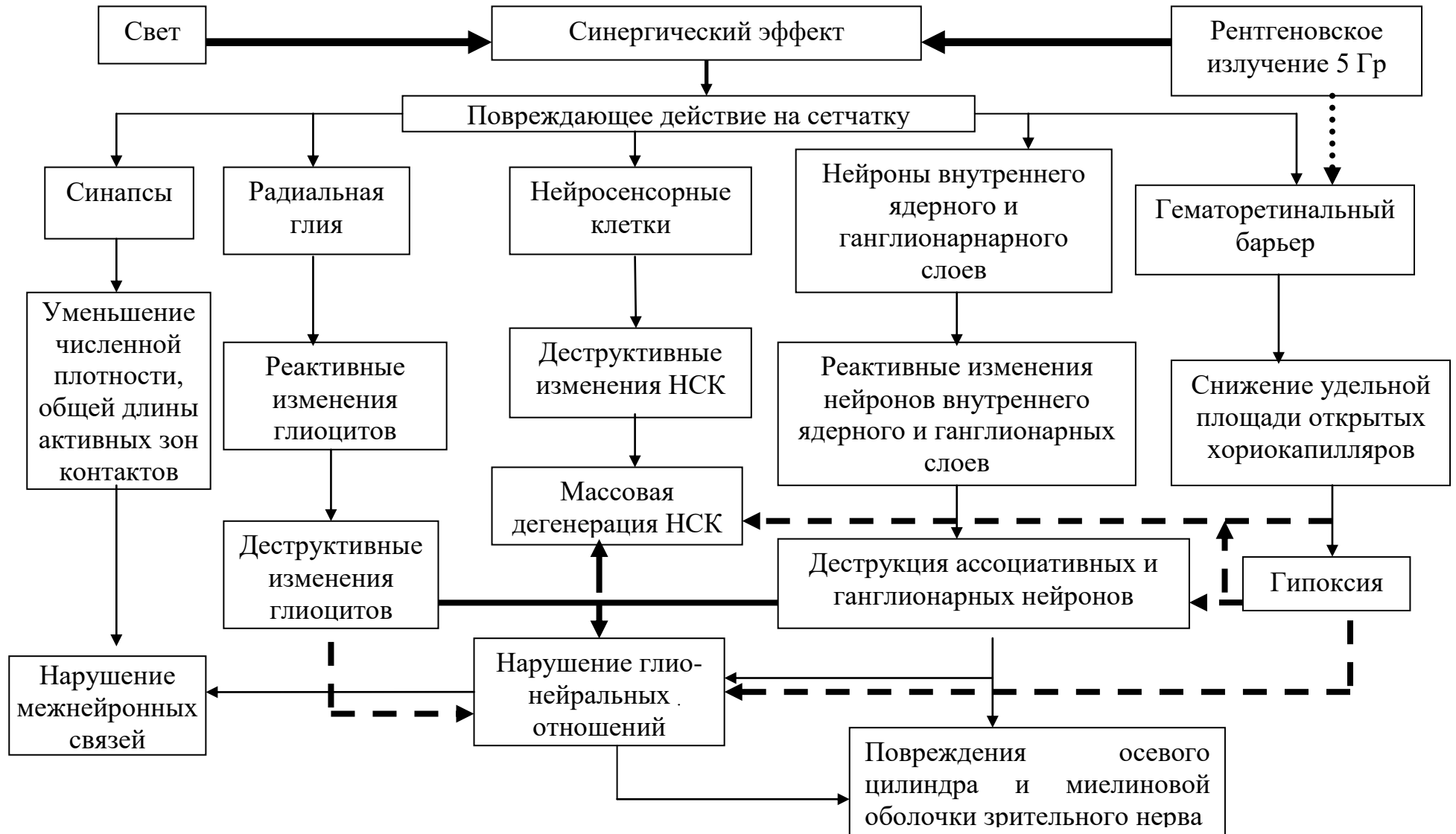


Рис. 1. Схема патоморфогенеза сетчатки при воздействии ионизирующей радиации и света

Наиболее ранние реакции наблюдаются в слоях, образованных НСК. Они проявляются дегенерацией наружных и внутренних сегментов, увеличением процента деструктивно измененных ядер, уменьшением количества рядов и численной плотности ядер в наружном ядерном слое. В сетчатке так же наблюдается повреждение синаптического аппарата, уменьшение численной плотности и общей длины активных зон контактов, приводящие к разобщению межнейронных связей. Параллельно с этим происходит увеличение содержания гиперхромных радиальных глиоцитов и нейронов внутреннего ядерного и ганглионарного слоев. Нарушения гематоретинального барьера проявляются в основном прогрессирующим снижением удельной площади срезов открытых хориокапилляров.

В поздние сроки эксперимента в ходе перестроек нейронов внутреннего ядерного и ганглионарного слоев идет образование новых синапсов внутреннего плексиморфного слоя и гипертрофия сохранившихся, но параллельно с этим наблюдается увеличение содержания деструктивных форм НСК, ассоциативных и ганглионарных нейронов. Глия отграничивает участки сетчатки с массовой гибелью НСК пластинчатыми мембранами. Изменения хориокапиллярной сети вызывают гипоксию, имеющую, как известно, выраженное радиомодифицирующее действие.

В последующих механизмах поражения структурных компонентов сетчатки важную роль играют деструктивные изменения радиальных глиоцитов. Эти процессы приводят к массовой гибели НСК и нарушениям нейрально-глиальных взаимоотношений. Дегенерация ганглионарных нейронов вызывает деструкцию зрительного нерва. При использовании в эксперименте высокоинтенсивного света (3500 лк) в поздние сроки комбинированного воздействия наблюдается большая сохранность количества рядов, численной плотности ядер и в целом популяции НСК, что позволяет предполагать некоторое ослабление альтеративных изменений. Вместе с тем необходимо отметить, что значительная доля из выявляемых ядер пикноморфна и, по-видимому, вследствие серьезных нарушений глии и ГРБ осталась не утилизированной.

Таким образом, по нашему мнению, наиболее чувствительными к изучаемым воздействиям являются НСК и синапсы. Это связано с содержанием в них большого количества мембранных структур: наружных сегментов, митохондрий, лизосом, синаптических пузырьков, пре- и постсинаптических мембран. Реакции пигментного эпителия в основном носят обратимый адаптивный характер и проявляются гипертрофией и повышением фагоцитарной активности. В ранний период (1-7 сут) эксперимента наблюдается явный синергизм действия изучаемых факторов, проявляющийся резким увеличением числа деструктивно измененных ядер НСК, снижением числа синаптических контактов и удельной площади открытых гемокапилляров. В более поздний период эксперимента (14-30 сут) на первый план выходят деструктивные нарушения глии и нейронов внутренних слоев сетчатки. Пигментный эпителий подвергается очаговым деструктивным

нарушениям. Активация репарационных процессов приводит к увеличению числа синапсов в основном за счет образования новых и гипертрофии сохранившихся контактов. Повреждение ганглионарных нейронов приводит к увеличению содержания нервных волокон с явлениями очаговой демиелинизации и дегенерации осевого цилиндра.

ВЫВОДЫ

1. Изменения структурных компонентов сетчатки и зрительного нерва при воздействии ионизирующей радиации и света зависят от дозы, времени и интенсивности облучения. В ранние сроки эксперимента (1-7-е сут) наблюдаются деструктивные (увеличение количества пикноморфных нейронов и глиоцитов, повреждение синаптического аппарата, демиелинизация зрительного нерва) и репаративные (реорганизация синаптоархитектоники, гипертрофия пигментоэпителиоцитов и радиальных глиоцитов) изменения. В поздний период (14-30-е сут) при постоянном высокоинтенсивном освещении и комбинированном облучении выраженность репарации в сетчатке и зрительном нерве снижается, а степень деструкции увеличивается.

2. Рентгеновское облучение (5, 10, 15 Гр) усиливает очаговые альтеративные изменения сетчатки и зрительного нерва, вызываемые светом (200, 3500 лк). Синергизм в действии ионизирующей радиации и света определяется по числу деструктивно измененных нейросенсорных клеток, нейронов внутренних слоев сетчатки, радиальных глиоцитов и нервных проводников. Синергический эффект в большей степени выражен при комбинированном воздействии рентгеновского излучения (5 Гр) и высокоинтенсивного света (3500 лк).

3. Наиболее чувствительны к повреждающему действию радиационного облучения и света нейросенсорные клетки. Длительное световое (200, 3500 лк) и комбинированные воздействия приводят к прогрессирующему снижению популяции, численной плотности и количества рядов ядер указанных клеток, истончению, а при использовании высокоинтенсивного света (3500 лк) и к очаговому выпадению соответствующих слоев сетчатки.

4. Рентгеновское (5, 10, 15 Гр), световое (200, 3500 лк) и комбинированные воздействия в ранние сроки эксперимента (1-7-е сут) вызывают гипертрофию и повышение фагоцитарной активности пигментоэпителиоцитов. В поздние сроки (14-30-е сут) при световых (200, 3500 лк) и комбинированных облучениях происходит очаговая деструкция, уменьшается толщина пигментного эпителия.

5. Реакции нейронов внутренних слоев сетчатки после рентгеновского (5, 10, 15 Гр), светового (200, 3500 лк) и комбинированных воздействий носят сходный характер, проявляются реактивными и деструктивными изменениями органелл. Мультиполярные нейроны ганглионарного слоя по чувствительности к изучаемым воздействиям занимают промежуточное положение между нейросенсорными клетками и ассоциативными нейронами.

6. Рентгеновское (5, 10, 15 Гр) и низкоинтенсивное световое (200 лк) воздействия приводят к уменьшению численной плотности синапсов

преимущественно за счет асимметричных контактов. Эффекты высокоинтенсивного светового (3500 лк) и комбинированных облучений возникают в более ранний период и проявляются уменьшением числа как симметричных, так и асимметричных синапсов. Компенсаторно-репаративные процессы протекают преимущественно за счет образования новых и гипертрофии сохранившихся синаптических контактов.

7. В ранний период (1-2-е сут) после рентгеновского (5 Гр), светового (200, 3500 лк) и комбинированных облучений склеральные отростки радиальных глиоцитов окружают и фагоцитируют деструктивно измененные нейросенсорные клетки. С увеличением дозы ионизирующей радиации (10, 15 Гр) и длительности светового воздействия (7, 14, 30 сут) вокруг погибших ядер нейросенсорных клеток образуются многослойные глиальные пластины, наступает дегенерация ядродержащих и витреальных частей глиоцитов, что усиливает альтеративные изменения нейронов сетчатки.

8. Рентгеновское (5 Гр), низкоинтенсивное световое (200 лк) излучения и их комбинация вызывают реактивные изменения органелл эндотелиоцитов, перицитов и полнокровие хорио- и интратретинальных капилляров. С увеличением дозы ионизирующей радиации (10, 15 Гр) и интенсивности светового воздействия (3500 лк) наступает деструкция эндотелиоцитов, базального комплекса, тромбоз и облитерация капилляров сетчатки и хориоидеи. Облучение ярким (3500 лк) светом и комбинированное воздействие (5 Гр, 3500 лк) приводят к снижению числа открытых, функционирующих капилляров хориоидеи и усилению деструктивных изменений гематоретинального барьера.

9. После световых (200, 3500 лк) воздействий возникают деструкция органелл и нейротрубочек в осевых цилиндрах и демиелинизирующие изменения зрительного нерва. При воздействии ионизирующей радиации (5, 10, 15 Гр) реакции зрительного нерва носят дозовую зависимость. Комбинация изучаемых факторов вызывает синергический эффект, приводящий к увеличению числа нервных проводников с дегенеративными изменениями осевых цилиндров и миелиновых оболочек.

10. Характер и динамика дегенеративных и репаративных процессов в сетчатке в поздние (1 мес) и отдаленные (6 мес) сроки после светового (3500 лк, 2 сут) и комбинированного (5 Гр, 3500 лк, 2 сут) облучений сходны. Деструкция пигментного эпителия и нейросенсорных клеток приводит к очаговому выпадению соответствующих слоев. В механизмах отдаленных повреждений нейронов и синапсов сетчатки ведущую роль играют деструктивные изменения гематоретинального барьера и процессы неоваскулогенеза.

11. Предложена математическая модель, позволяющая оценить чувствительность, динамику поражения нейрональной популяции и радиальных глиоцитов сетчатки, прогнозировать световые и комбинированные поражения во временной и дозовой зависимости.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Дегенеративные изменения сетчатки глаза белых крыс при воздействии высокоинтенсивного света // Морфология. - 1998. - №3 - С. 97. Соавт. С. В. Логвинов, И. С. Малиновская.
2. Изменение сосудистых элементов сетчатой оболочки глаза при взаимодействии высокоинтенсивным светом // Всероссийская научная конференция анатомов гистологов и эмбриологов “Закономерности морфогенеза и регуляции тканевых процессов в нормальных, экспериментальных и патологических условиях”, посвященная 70-летию П. В. Дунаева. – Тюмень – 1998. – С. 67. Соавт. С. В. Логвинов.
3. Изменения синапсов внутреннего плексиморфного слоя сетчатой оболочки глаза при комбинированном воздействии ионизирующей радиации и света высокой интенсивности // Морфологические науки практике здравоохранения и ветеринарии. - Омск - 1999. С. 127. Соавт. С. В. Логвинов.
4. Комбинированное воздействие света и циклофосфана на нервные элементы глаза // Актуальные вопросы экспериментальной морфологии. – Томск – 1999. - С. 78. Соавт. С. В. Логвинов, И. С. Малиновская.
5. Закономерности структурных изменений сетчатки при радиационных и комбинированных изменениях // Актуальные вопросы экспериментальной морфологии. – Томск – 1999. - С. 25-37. Соавт. С. В. Логвинов, И. С. Малиновская, Н. П. Буймова, О. И. Кривошеина, Е. Ю. Варакута, Н. И. Кайрова.
6. Структурные изменения сетчатки при комбинированном воздействии света и рентгеновских лучей // Морфология. – 2000. – Т.117, вып. 1. - С. 19-23. Соавт. С. В. Логвинов.
7. Фотоповреждение нейросенсорных клеток сетчатки после предварительного рентгеновского облучения // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2000. - № 8. - С. 237-240. Соавт. С. В. Логвинов
8. Изменения сосудов сетчатки при комбинированном воздействии высокоинтенсивного света и ионизирующей радиации // Третий конгресс с международным участием “Паллиативная медицина и реабилитация в здравоохранении”. – 2000. – Анталия - С. 73. Соавт. С. В. Логвинов
9. Реакции радиальной глии сетчатки на комбинированное воздействие ионизирующей радиации и света высокой интенсивности // Материалы Российской конференции “Организм и окружающая среда . жизнеобеспечение и защита человека в экстремальных условиях.” Москва 26-29 сентября - 2000г. С. 147. Соавт. С. В. Логвинов
10. Поражение сетчатки глаза при воздействии света на фоне аллоксанового диабета. // Вестник РГМУ – 2001 – №2 (17) – С. 125. Соавт. Е. Ю. Варакута
11. Динамика развития фотоповреждения при аллоксановом диабете. // Материалы XXXV юбилейной межвузовской научной конференции “Актуальные проблемы теоретической, экспериментальной и клинической медицины. – Тюмень – 2001 – С. 62. Соавт. Е. Ю. Варакута
12. Изменения сетчатки глаза на ранней стадии аллоксанового диабета. // “Актуальные проблемы эволюционной и популяционной физиологии

человека”. Материалы I-ой Всероссийской научной конференции с участием зарубежных специалистов. – Тюмень. - 2001. С. 105. Соавт. С. В. Логвинов, С.В. Рыжов, Е. Ю. Варакута

13. Изменение синапсов внутреннего плексиморфного слоя сетчатки при высокоинтенсивном световом воздействии на фоне аллоксанового диабета // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической морфологии. - Томск: 2002. - Выпуск 2. С. 47. Соавт. Е. Ю. Варакута, Д. А. Дробатулина, С. В. Логвинов.

14. Морфологические изменения сетчатки при длительном воздействии светом высокой интенсивности // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической морфологии. - Томск: 2002. - Выпуск 2. С. 35. Соавт. Д. А. Дробатулина, И. С. Малиновская, Е. Ю. Варакута, Л. Р. Мустафина, С. В. Логвинов.

15. Закономерности и тканевые механизмы пострadiационных изменений зрительного анализатора при многофакторных воздействиях // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической морфологии. - Томск: 2002. - Выпуск 2. С. 46. Соавт. С. В. Логвинов, И. С. Малиновская, Е. Ю. Варакута, Е. П. Михуля, Д. А. Дробатулина, Л. Р. Мустафина.

16. Характер и динамика фотодегенерации нейросенсорных клеток сетчатки на фоне аллоксанового диабета // Бюллетень сибирской медицины - 2002.- № 2 – С. 46-52. соавт. С.В Логвинов., Е. Ю. Варакута.

17. Изменение структур глаза при световом воздействии // Морфология - 2002. - № 2-3 - С 128. Соавт. Л. Р. Мустафина, Е. Ю. Варакута, Д. А. Дробатулина, С. В. Логвинов.

18. Строение сетчатки и циркадианных пейсмекеров при световых и комбинированных воздействиях // Морфология - 2002. - № 2-3 - С. 94. Соавт. Е. Ю. Варакута, Д. А. Дробатулина, С. В. Логвинов, А. В. Герасимов.

19. Динамика изменений нейронов наружного и внутреннего слоёв сетчатки при фотоповреждении // Актуальные проблемы медицины и биологии, Томск. - 2003. - Вып 2. С. 108. Соавт. Д. А. Дробатулина, Е. П. Михуля, С. В. Логвинов.

20. Динамика структурных изменений сетчатки при длительном воздействии яркого света // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2003. - № 10. - С. 463-466. Соавт. С.В. Логвинов, Е. Ю. Варакута, Д. А. Дробатулина.

21. Структурные изменения гематоретинального барьера при комбинированном воздействии ионизирующей радиации и света высокой интенсивности // Сибирский медицинский журнал. - 2003. - № 4. - С. 54-58. Соавт. С. В. Логвинов.

22. Реакция глии сетчатки на фотоповреждение // Актуальные проблемы медицины и биологии, Томск. - 2004. - Вып 3. - № 1-3. – С. 118.

23. Реакция нейронов сетчатки на фотоповреждение // Актуальные проблемы медицины и биологии, Томск. - 2004. - Вып 3. - № 1-3 – С. 118.

24. Морфологические изменения нейросенсорных клеток сетчатки при низкоинтенсивном световом воздействии //Актуальные проблемы биологии,

медицины и экологии, Томск 2004 г. - Т. 3., № 4. - С.6. Соавт. С. В. Логвинов, Е. П. Михуля, А. А. Жданкина, Е. Ю. Варакута.

25. Поражения сетчатки глаза при низкоинтенсивном световом воздействии // Морфология. – 2004. - №4. – С. 27. Соавт. С. В. Логвинов, Е. Ю. Варакута, А. А. Жданкина, И. С. Малиновская, Д. А. Дробатулина, Е. Ю. Аникина.

26. Структурные изменения сетчатки при комбинированном воздействии ионизирующей радиации и света. // Морфология. – 2004. - № 4. – С. 27. Соавт. С. В. Логвинов, Е. Ю. Варакута, А. А. Жданкина, И. С. Малиновская, Д. А. Дробатулина, Е. Ю. Аникина.

27. Эффекты комбинированного воздействия ионизирующей радиации и света на сетчатку глаза // Радиационная биология, радиоэкология. – 2004. том 44. - № 6. – С. 661-667. С. В. Логвинов, Е. Ю. Варакута, Д. А. Дробатулина.

28. Структурные изменения сетчатки и стекловидного тела при моделировании пролиферативной витреоретинопатии на фоне аллоксанового диабета // Морфология. - 2005 – Т. 127. - № 3. – С. 34-37. Соавт. С. В. Логвинов, Е. Ю. Варакута, О. И. Кривошеина, И. В. Запускалов.

29. Изменения сетчатки и зрительного нерва при комбинированном воздействии ионизирующей радиации и высокоинтенсивного света // Вятский медицинский вестник Кировской медицинской академии, Киров, 2005 г.- С.56. Соавт. Е. Ю. Аникина, Е. Ю. Варакута, Е. П. Михуля, А. А. Жданкина, Н. В. Васильев

30. Влияние асковертина на морфологические изменения сетчатки крыс при воздействии высокоинтенсивного света // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2005. - № 11. С. 591-594. Соавт. С. В. Логвинов, М. Б. Плотников, Е. Ю. Варакута, А. А. Жданкина, Е. П. Михуля.

31. Поражение клеток нейральной сетчатки и ретинального пигментного эпителия глаз крыс при воздействии высокоинтенсивного света на фоне аллоксанового диабета // Радиационная биология. Радиоэкология – 2005 - № 6 – С. 732-736. Соавт. С. В. Логвинов, Е. Ю. Варакута.

32. Реакция зрительного нерва на комбинированное воздействие ионизирующей радиации и яркого света // Бюллетень сибирской медицины - 2006 - № 2. С. 130-133.

33. Реакция нейронов внутренних слоев сетчатки на комбинированное воздействие ионизирующей радиации и света // Бюллетень сибирской медицины - 2006 - № 2. С.93-97. Соавт. Светлик М. В.

34. Реакция радиальных глиоцитов сетчатки при фотоповреждении на фоне коррекции асковертином как показатель репарационных механизмов сетчатки // Актуальные проблемы учения о тканях, Санкт–Петербург, 2006 – С 58-59. Соавт. С. В. Логвинов, Е. Ю. Варакута, А. А. Жданкина, Е. П. Михуля, Е. Ю. Аникина.