Морфологические изменения клеточных элементов сетчатки глаза при длительном низкоинтенсивном световом воздействии

Логвинов С.В., Варакута Е.Ю., Потапов А.В., Михуля Е.П., Жданкина А.А.

Morphologic changes of retina cellular elements under long low intensity light exposure

Logvinov S.V., Varakouta Ye.Yu., Potapov A.V., Mikhoulia Ye.P. Zhdankina A.A.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Логвинов С.В., Варакута Е.Ю., Потапов А.В. и др.

С помощью электронной микроскопии и морфометрического анализа изучены структурные изменения сетчатки глаз 40 белых беспородных крыс-самцов при воздействии света интенсивностью 200 лк в течение 1, 7, 14 и 30 сут. Выявлены структурные изменения всех клеточных элементов сетчатки, особенно выраженные в нейросенсорных клетках (НК) и радиальных глиоцитах. Максимальное содержание НК с деструкцией ядра наблюдается после 7 сут облучения и достигает $(4,60 \pm 0,3)\%$ (контроль $(0,40 \pm 0,02)\%$). Изменения радиальной глии носят как регрессивный, так и прогрессивно-пролиферативный характер. Изменения нейронов внутренних слоев сетчатки имеют в основном обратимый характер.

Ключевые слова: сетчатка, свет.

Structural changes of eye retina in 40 male white rats under the influence of light with intensity of 200 lk during 1, 7, 14 and 30 days were studied using electron microscopy method and morphometric analysis. Structural changes of all cell elements of retina were revealed which were particularly expressed in neurosensory cells and in radial gliocytes. Maximum number of neurosensory cells with destruction of nucleus was observed after 7 days of exposure and achieves its maximum $(4,6 \pm 0,3)\%$ compared to controls $(0,40 \pm 0,02)\%$. Changes of radial glial cells have both regressive and progressively -proliferative character. Changes of neurons of retina internal layers have mainly reversible character.

Key words: retina, light.

УДК 617.735:616-001.14/15

Введение

Широкое распространение электромагнитных излучений во всех сферах жизнедеятельности человека (медицине, промышленности, быту) приводит к увеличению лучевой нагрузки на организм, в частности, на орган зрения [2, 5]. В литературе имеется большое число сообщений о повреждающем действии света на сетчатку глаза человека и животных [7, 8, 12]. Степень повреждения зависит от множества факторов: интенсивности освещения, времени экспозиции, спектральных характеристик источников света, возраста и реактивности облучаемого организма [11, 13]. Исследования ряда авторов показали, что ранние изменения сетчатки возникают уже при световом воздействии интенсивностью 65—130 лк [15, 17].

Цель настоящего исследования — установить характер и динамику изменений клеточных элементов

сетчатки глаза при длительном низкоинтенсивном световом воздействии.

Материал и методы

Изучена сетчатка глаз 40 беспородных половозрелых белых крыс-самцов. Животных облучали люминесцентными лампами ЛБ-40, имеющими максимум излучения в желто-зеленой области спектра. Для облучения использовалась специальная установка из прямоугольных рефлекторов с вмонтированными в них лампами, освещающая клетку с пяти сторон. Освещенность животных составляла 200 лк. Крыс 1-й группы ($n = 5$) облучали светом с указанными характеристиками в течение 1 сут, 2-й группы ($n = 5$) — 7 сут, 3-й группы ($n = 5$) — 14 сут, 4-й группы ($n = 5$) — 30 сут. Контрольным материалом служила сетчатка глаз 20 интактных крыс, которых содержали в иден-

тичных с экспериментальными животными условиях вивария. Все животные содержались в условиях искусственного светового режима: 12 ч — день, 12 ч — ночь с интенсивностью дневного освещения 25 лк.

Декапитацию производили под эфирным наркозом сразу после облучения, в аналогичные экспериментальным группам сроки производили взятие контрольного материала.

Для световой микроскопии заднюю стенку глаза фиксировали в жидкости Карнуа. Срезы толщиной 5—7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Для электронной микроскопии центральные участки задней стенки глаза фиксировали в 2,5%-м глутаральдегиде на какодилатном буфере (рН = 7,4), постфиксировали в 1%-м растворе четырехоксида осмия и заливали в эпон. Полутонкие срезы окрашивали толуидиновым синим, ультратонкие контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, просматривали и фотографировали в электронном микроскопе JEM-7A. На парафиновых срезах с помощью окулярной измерительной сетки Автандилова высчитывали удельную площадь слоев сетчатки. На полутонких срезах производили подсчет нейросенсорных клеток с деструкцией ядра (пикноз, рексис, лизис) на 1000 клеток, определяли численную плотность ядер (на 1 мм² среза) в наружном и внутреннем ядерных слоях, процент пикноморфных радиальных глиоцитов и нейронов внутреннего ядерного слоя, ганглионарных нейронов с тотальным и очаговым хроматолизом на 200 клеток с каждой сетчатки. При проведении статистической обработки результатов использованы методы описательной статистики (определение среднего значения и ошибки среднего), непараметрический критерий Манна—Уитни.

Результаты

После облучения в течение 1 сут изменения пигментоэпителиоцитов были незначительными. В отдельных клетках электронно-микроскопически обнаруживалось увеличение содержания фагосом, что, по-видимому, свидетельствует о повышении фагоцитарной активности пигментного эпителия. Изменения нейросенсорных клеток характеризуются усилением дегенеративных процессов в наружных сегментах части нейросенсорных клеток. Данные изменения проявляются расслоением мембранных дисков, появлением мелко-

гранулярного материала в межмембранных пространствах.

После облучения в течение 7 сут на светооптическом уровне в части пигментоэпителиоцитов наблюдается гиперхромия ядер. Некоторые клетки увеличены в объеме, вследствие чего они выбухают в фотосенсорный слой. В их цитоплазме большое количество фагосом и вакуолей. При ультрамикроскопическом исследовании в апикальных отделах пигментоэпителиоцитов выявлялись крупные фрагменты наружных сегментов фоторецепторов, мембранные диски которых расслоены, дезориентированы и находились на различных стадиях лизиса. Базальная складчатость у таких клеток увеличена. Однако основная масса пигментоэпителиоцитов имела уплощенную форму, характеризовалась гиперконденсацией хроматина в ядре, наличием электронно-плотного мелкогранулярного материала в апикальной части цитоплазмы и отсутствием микроворсинок. В связи с этим уменьшалась удельная площадь пигментного эпителия до $(3,08 \pm 0,15)\%$ (контроль — $(5,42 \pm 0,09)\%$; $p < 0,05$).

В фотосенсорном слое наблюдалось истончение и местами фрагментация дистальных отделов наружных сегментов нейросенсорных клеток. Ультраструктурные изменения проявлялись пузырьковидной дегенерацией и разрывом мембран. В отдельных случаях наблюдалась тотальная деструкция всего наружного сегмента.

В эллипсоидах внутренних сегментов происходило набухание митохондрий, а в единичных клетках указанные отделы подвергались деструкции. Перикарионы некоторых нейросенсорных клеток отечны, в них наблюдалась деструкция органелл (рис. 1).

Рис. 1. Нейросенсорные клетки после низкоинтенсивного светового воздействия в течение 7 сут. Отек перикариона, деструкция органелл. Я — ядро. Ув. 10 000

После облучения в течение 14 и 30 сут преобладали уменьшенные в размерах пигментозпигментоциты, в цитоплазме которых наблюдалась деструкция органелл, число микроворсинок было уменьшено, а базальная складчатость цитоплазмы снижена.

В фотосенсорном слое отмечалось усиление деструктивных процессов в наружных и внутренних сегментах. Субретинальное пространство заполнено их фрагментами. Часть наружных отростков восстанавливали свое строение за счет естественного обновления мембранных дисков. После облучения в течение 14 сут в наружном ядерном слое увеличивалось содержание клеток с деструкцией ядра до $(4,6 \pm 0,3)\%$ (контроль $(0,4 \pm 0,02)\%$; $p < 0,05$), после 30 сут облучения этот показатель снижался до $(2,74 \pm 0,22)\%$, вероятно, за счет адаптации клеток к световому воздействию и фагоцитоза ранее погибших клеток (рис. 2). В наружном ядерном слое наблюдался отек и гипертрофия склеральных отростков радиальной глии (рис. 3), что наряду с гибелью нейросенсорных клеток приводит к значимому снижению численной плотности их ядер. Минимальные значения этого показателя наблюдаются после облучения в течение 30 сут — $(10,46 \pm 0,46)$ тыс. на 1 мм^2 среза (контроль — $(39,60 \pm 0,27)$ тыс. на 1 мм^2 среза; $p < 0,05$).

Рис. 2. Содержание деструктивно измененных нейросенсорных клеток сетчатки глаза при низкоинтенсивном световом воздействии разной продолжительности; * — достоверность различий ($p < 0,05$) по сравнению с контролем

Изменения нейронов внутреннего ядерного слоя характеризуются как реактивными, так и деструктивными изменениями. Горизонтальные нейроны после светового облучения характеризуются набуханием и отеком цито-

плазмы различной степени выраженности. Ультрамикроскопически выявляются расширение цистерн эндоплазматического ретикулума, набухание и деструкция крист митохондрий. Более выраженные изменения наблюдались в амакринных и биполярных нейронах. При этом амакринные нейроны чаще вовлекаются в деструктивные процессы по сравнению с биполярными.

Рис. 3. Отек склеральных отростков радиальной глии после 14 сут облучения. НК — нейросенсорная клетка, РГ — радиальная глия. Ув. 7 200

После низкоинтенсивного светового облучения ассоциативные нейроны можно разделить на три типа: «светлые», гиперхромные и пикноморфные. Перикарионы «светлых» клеток отекающие. В их цитоплазме наблюдались деструкция органелл, митохондрии приобретали вид полых мешочков, окруженных мембраной (рис. 4).

Рис. 4. Биполярные нейроны внутреннего ядерного слоя сетчатки глаза после 7 сут облучения. Отек перикариона, деструкция митохондрий. Я — ядро, М — митохондрия. Ув. 10 000

Гиперхромные характеризовались более конденсированным хроматином в ядре и меньшими размерами клеток. В них увеличено число органелл, а цитоплазма содержит много свободных рибосом. Эти клетки располагаются на границе с наружным сетчатым слоем. Пикноморфные нейроны характеризовались осmioфильной вакуолизированной цитоплазмой, пикнозом ядра, что является признаком деструкции. Количественный анализ не показал статистически значимых отличий в содержании пикноморфных нейронов между экспериментальными группами и контролем, что свидетельствует об относительной интактности ассоциативных нейронов.

Особенностью мультиполярных нейронов ганглионарного слоя является хорошо выраженная хроматофильная субстанция и высокая плотность органелл. Поэтому для объективной оценки реакции мультиполярных нейронов на световое воздействие использовалась количественная оценка содержания клеток с хроматолизом и деструктивными нарушениями в виде осmioфилии цитоплазмы и пикноза ядра.

После 1 сут светового воздействия в части мультиполярных нейронах наблюдались расширение цистерн эндоплазматической сети, набухание митохондрий, уменьшение числа полисом и появление микровезикул в цитоплазме, а также нейронов с очаговым хроматолизом, содержание которых достигало $(11,02 \pm 0,73)\%$ (контроль — $(3,40 \pm 0,19)\%$; $p < 0,05$).

После 7 сут светового облучения значимо увеличивалось содержание нейронов с очаговым хроматолизом и достигало $(20,07 \pm 0,55)\%$. Это состояние обратимо и отражает нарушение обмена функциональных белков и РНК [1]. Среди мультиполярных нейронов обнаруживались также пикноморфные клетки, которые характеризуются деформацией ядра и перикариона, высокой электронной плотностью кардио- и цитоплазмы, редукцией органелл. Их содержание после облучения — $(2,74 \pm 0,18)\%$ (контроль — $(1,55 \pm 0,17)\%$; $p < 0,05$). Максимальное число таких нейронов наблюдалось после 14 сут облучения и составляло $(5,03 \pm 0,65)\%$. Содержание клеток с тотальным хроматолизом не превышало контрольных значений во всех экспериментальных группах.

Изменения ультраструктуры нервных клеток сопровождаются изменениями глии. После 1 сут свето-

вого воздействия ультраструктурное исследование выявило повышение электронной плотности цитоплазмы части радиальных глиоцитов в области глиоглиальных и глионейросенсорных контактов. Во внутреннем ядерном слое встречались единичные пикноморфные радиальные глиоциты, характеризующиеся повышением электронной плотности, вакуолизацией цитоплазмы и пикнозом ядра. Деструктивно измененные глиоциты располагались в основном на границе внутренних ядерного и сетчатого слоев. После 7—14 сут облучения отростки глиоцитов характеризовались низкой электронной плотностью и высоким содержанием фагосом. Митохондрии в них набухшие, лишены крист. Склеральные отростки радиальных глиоцитов, расположенные в наружном ядерном слое, резко гипертрофированы. В местах контакта с деструктивно измененными нейросенсорными клетками они содержат большое количество мембранных комплексов и миелиноподобных телец. После 30 сут облучения в наружном ядерном слое наблюдалась пролиферация глиальных отростков. Радиальная глия активно фагоцитировала деструктивно измененные ядра нейросенсорных клеток. Местами на уровне наружной пограничной мембраны наблюдалось прорастание в субретинальное пространство глиальных отростков, содержащих глыбки и фрагменты наружных и внутренних сегментов нейросенсорных клеток.

Количественный анализ показал увеличение числа пикноморфных радиальных глиоцитов до $(11,02 \pm 0,51)$ против $(2,65 \pm 0,13)\%$ в контроле ($p < 0,05$) после 7 сут облучения. Одновременно усиливалась пролиферативная активность глиоцитов — возрастает удельная плотность глии во ВЯС до $(10,17 \pm 0,73)$ тыс. на 1 мм^2 среза (контроль — $(4,38 \pm 0,50)$ тыс. на 1 мм^2 среза; $p < 0,05$) и повышается глионейрональный индекс до $0,66 \pm 0,06$ (контроль $0,37 \pm 0,01$; $p < 0,05$). После 14 и 30 сут облучения эти показатели были значимо выше контроля, но снижены по сравнению с предыдущей экспериментальной группой.

Обсуждение

Наиболее чувствительны к низкоинтенсивному световому воздействию нейросенсорные клетки, а именно — их наружные сегменты, являющиеся основными акцепторами световых лучей. Изменения в них появляются уже при облучении в течение 1 сут. В настоящее время доказан универсальный механизм дан-

ных изменений, основную роль в которых играет активизация перекисного окисления липидов, имеющая особое значение для структур сетчатки, в мембранах которых более половины фосфолипидов содержат полиеновые жирнокислотные остатки, восприимчивые к атаке липидными радикалами и активными формами кислорода [6].

Наряду с высокой чувствительностью нейросенсорных клеток к световому воздействию следует отметить их выраженную регенерационную способность. Даже при полной деструкции наружного сегмента и отрыве эллипсоида, но сохранении перикариона и ядра возможна последующая регенерация [3, 4]. Помимо высокой регенераторной активности нейросенсорные клетки достаточно пластичны и способны адаптироваться к меняющимся условиям освещенности. Так, при переключении светового режима с 3 лк на 200 лк наблюдается увеличение количества аутофагосом, содержащих опсин во внутренних сегментах фоторецепторов, что приводит к удалению избыточного количества зрительного пигмента и рассматривается как адаптивная реакция при увеличении интенсивности облучения [14].

Кроме того, пигментный эпителий защищает НК от окислительного стресса. Деструкция наружных сегментов сопровождается накоплением фагосом, содержащих мембранные диски, в пигментноэпителиоцитах. В защитных по отношению к нейросенсорным клеткам механизмах предполагается важная роль антирадикального влияния меланина пигментного эпителия. В этой связи наиболее подвержена световому облучению сетчатка крыс-альбиносов по сравнению с пигментированными животными [16]. При длительном освещении пигментный эпителий не может утилизировать такое количество разрушенных фоторецепторных мембран, которые накапливаются в нем в виде липофусциновых гранул. Липофусцин при действии на него видимого света способен генерировать кислород и сам является фотосенсибилизатором [9, 10]. В результате срыва адаптации развивается гибель нейросенсорных клеток, особенно выраженная после облучения в течение 14 сут.

Деструкция нейросенсорных клеток сопровождается разрастанием склеральных отростков радиальных глиоцитов в НЯС, которые прорастают и в субретинальное пространство. В связи с этим, а также с гибелью части НК снижается численная плотность ядер в

НЯС, особенно после облучения в течение 30 сут. Витреальные отделы радиальной глии в основном остаются мало измененными, однако часть глиоцитов пикноморфна уже после 1 сут облучения. Наиболее выражена деструкция глиоцитов после 7—14 сут облучения.

Одновременно отмечается всплеск пролиферативной активности глии. Хотя митозы в радиальной глии не наблюдались, о пролиферативной активности можно судить косвенно по увеличению глионейронального индекса и удельной плотности глиоцитов в ВЯС. Следует отметить, что радиальная глиа — это особый вид глии, который помимо опорноизолирующей и фагоцитарной функции участвует в транспорте многих метаболитов, жизненно необходимых для всех нейронов сетчатки, поэтому вполне закономерно, что изменения в них появляются раньше и наиболее выражены, чем в нейронах внутренних слоев сетчатки. Ассоциативные и ганглионарные нейроны оказались относительно интактны к длительному низкоинтенсивному световому воздействию. В ганглионарном слое увеличено содержание нейронов с очаговым хроматолизом, максимальное содержание таких нейронов наблюдается после 7 сут облучения, а после облучения в течение 30 сут эти значения соответствуют контролю. Вероятно, это связано с адаптацией нейронов к длительному освещению, а поскольку очаговый хроматолиз — это обратимое состояние, то возможно восстановление данных клеток.

Заключение

Таким образом, длительное низкоинтенсивное световое воздействие вызывает неодинаковой выраженности изменения всех клеточных элементов сетчатки. Наиболее чувствительны к фотоповреждению нейросенсорные клетки и радиальная глиа. Разная восприимчивость клеток, вероятно, связана с механизмами фотодегенерации, а также с репарационными возможностями тех или иных клеточных элементов.

Литература

1. Боголепов Н.Н. Ультраструктура мозга при гипоксии. М.: Медицина, 1979. 168 с.
2. Измеров Н.Ф., Суворов Г.А., Куралесин Н.А. Физические факторы. Эколого-гигиеническая оценка и контроль: Практическое руководство. В 2 т. М.: Медицина, 1999. Т. 1. 325 с.
3. Логвинов С.В. Радиация и зрительный анализатор: нейроморфологические аспекты. Томск: НТЛ, 1998.

- 138 с.
4. Логвинов С.В., Зуев В.Г., Ушаков И.Б., Тютрин И.И. Очерки неионизирующей радионейробиологии: структурно-функциональный анализ. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1994. 208 с.
5. Островский М.А., Федорович И.Б. Ретиналь как сенсibilизатор фотоповреждения ретинальсодержащих белков сетчатки глаза // Биофизика. 1981. Т. 26. С. 398—403.
6. Преображенский П.В., Шостак В.И., Балашевич Л.И. Световые повреждения глаз. Л.: Медицина, 1986. 200 с.
7. Arafat A.F., Dutton G.N., Wykes W.N. Subclinical operating microscope retinopathy: the use of static perimetry in its detection // Eye. 1994. № 8. P. 467—472.
8. Bradham M.S., Montgomery D.M., Moseley H., Dutton G.N. Quatitative assessment of the blue-light hazard during indirect ophthalmoscopy and the increase in the «sefe» operating period achieved using a yellow lens // Ophthalmology. 1995. V. 102. № 5. P. 799—804.
9. Fite K.V., Bengston L., Donaghey B. Experimental light damage increases lipofuscin in the retinal pigment epithelium of Japanese quail (*Coturnix japonice*) // Exp. Eye. Res. 1993. V. 57. № 4. P. 448—453.
10. Gaillard E.R., Atherton S.J., Elderred G., Dillan J. Photophysical studies on human retinal lipofuscin // Photochem. Photobiol. 1995. V. 61. № 5. P. 448—453.
11. Gorgels T.G., Van Norren D. Ultraviolet and green light cause different types of damage in rat retina // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1995. V. 36. № 5. P. 851—863.
12. Michels M., Sternberg P.Jr. Operating microscope-induced retinal phototoxicity: pathophysiology, chemical manifestations and revention // Surv. Ophthalmol. 1990. V. 34. № 4. P. 237—252.
13. Rapp L.M., Tolman B.L., Dhindsa H.S. Separate mechanisms for retinal damage by ultraviolet-A and mid-visible light // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1990. V. 31. № 6. P. 1186—1190.
14. Remu C.E., Wolfrum U., Imsand C. et al. Photoreceptor autophagy: effects of light history on number and opsin content of degradative vacuoles // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1999. V. 40. P. 2398—2404.
15. Rowland S.L., Dawson W.W. Injuring retinal threshold of cyclic light for all rats // Curr. Eye. Res. 1986. V. 2. P. 137—147.
16. Wasowicz M., Morice C., Ferrari P. et al. Long-term effects of light damage on the retina of albino and pigmented rats // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2002. V. 43. P. 813—820.
17. Williams R.A., Howard A.G., Williams T.P. Retinal injury on pigmented and albino rats exposed to low intensive cyclic light after unique mydriatic influence // Curr. Eye. Res. 1985. V. 4. № 2. P. 97—102.

Поступила в редакцию 10.03.2006 г.