

УДК 617.735-007.281-089

Д.В. Жмурик¹, Н.Е. Думброва², Н.И. Молчанюк², М.В. Мищенко¹

ВЛИЯНИЕ ТРИДЦАТИСУТОЧНОЙ ТАМПОНАДЫ ПЕРФТОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ СЕТЧАТКИ ГЛАЗ КРОЛИКОВ

Киевская городская клиническая офтальмологическая больница

«Центр микрохирургии глаза»¹ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины»², г. Одесса

Резюме. Экспериментальное исследование было проведено на 12 кроликах (24 глаза). Всем животным была выполнена задняя закрытая субтотальная витректомиа с последующей 30-суточной тампонадой перфторорганическим соединением (ПФОС) – правый глаз; «легким» силиконовым маслом или физраствором (левый глаз). Электронно-микроскопическое исследование было проведено после завершения тампонады через 7, 14 и 30 суток. После 30-суточной тампонады

применяемых веществ, структуры сетчатки отвечают однотипными изменениями. Однако эти изменения относятся к разряду реактивных, а не повреждающих, и носят обратимый характер. ПФОС могут рассматриваться как кандидаты для проведения кратковременной тампонады.

Ключевые слова: ультраструктура, сетчатка, перфторорганические соединения, «легкое» силиконовое масло.

Введение. Использование для кратковременной послеоперационной тампонады веществ с высоким удельным весом при хирургическом лечении регматогенных (осложненных передней пролиферативной витреоретинопатией) и далеко зашедших тракционных диабетических отслоек сетчатой оболочки (ОСО), могло бы расширить показания к оперативному лечению и улучшить не только анатомические, но и функциональные результаты [1]. Кратковременная тампонада обеспечивает интра- и межоперационную эвакуацию остаточной субретинальной жидкости, приводит к полноценной адаптации сетчатки, может применяться с гемостатической целью, что дает возможность вводить силиконовое масло на «чистую» сетчатку, а также при необходимости проводить дополнительную аргоновую лазерную коагуляцию. ПФОС имеют удельный вес в среднем в два раза больше воды, обладают ценными для витреоретинальной хирургии качествами – химической и метаболической инертностью, прозрачностью и низкой вязкостью. Впервые в медицине они были представлены в 1966 году. С начала восьмидесятых годов жидкие перфторуглероды благодаря своей газотранспортной функции используются в качестве кровезаменителей (перфторан). О первом опыте интравитреального введения ПФОС было сообщено Haidt и соавторами в 1982 году, с тех пор они активно используются интраоперационно. Однако, отношение витреоретинальных хирургов к кратковременной тампонаде витреальной полости ПФОС двоякое, остается открытым вопрос о механическом повреждающем действии ПФОС.

Авторы изучали действие ПФОС на сетчатку глаза экспериментальных животных с помощью электроретинографии, световой и электронной микроскопии, которые проводились без завершения тампонады, либо на различных сроках после выведения ПФОС с витреальной полости с одним определенным сроком тампонады [2, 4], что по нашему мнению, не дает возможности оценить

обратимость изменений сетчатки после тампонады ПФОС и операционной травмы.

Актуально было бы провести исследования влияния на ультраструктуру сетчатки глаза кроликам 30-суточной тампонады в условиях максимально приближенным к реальным клиническим с проведением задней закрытой субтотальной витректомии. Используя для тампонады ПФОС максимальной степени очистки и с большим удельным весом (перфторпергидронафталин – 1.94 г/см³). Также изучить ультраструктуру сетчатки в разные сроки после завершения тампонады ПФОС и сравнить эти данные с результатами, полученными после тампонады не только физиологическим раствором, но и со стандартным, широко используемым тампонирующим веществом – «легким» силиконовым маслом.

Также необходимо учитывать, что кролик постоянно находится в одном положении и для электронно-микроскопического исследования (ЭМИ) необходимо выделять нижние сегменты сетчатки для изучения действия ПФОС и верхние – для изучения влияния «легкого» силиконового масла.

Цель исследования. Изучить влияние тампонады ПФОС (30 суток) на ультраструктуру сетчатки глаза кролика в эксперименте; сравнить действия ПФОС, физиологического раствора и «легкого» силиконового масла в динамике проведения ЭМИ на различных сроках после завершения тампонады (7, 14, 30 дней).

Материал и методы. Экспериментальное исследование проведено на 12 кроликах-самцах (24 глаза) породы шиншилла массой 3,5±0,5 кг, в возрасте 6,5±0,5 месяцев. Тампонада ПФОС составляла 30 суток.

ЭМИ сетчатки проводились всем животным на различных сроках после завершения тампонады витреальной полости ПФОС, физиологическим раствором, и «легким» силиконовым маслом. Все животные после завершения тампонады бы-

ли разделены на три группы, соответственно срокам исследования:

- первая группа (четыре кролика) – проведение ЭМИ сетчатки через семь суток после завершения тампонады;

- вторая группа (четыре кролика) – проведение ЭМИ сетчатки через 14 суток после завершения тампонады;

- третья группа (четыре кролика) – проведение ЭМИ исследования сетчатки через 30 суток после завершения тампонады.

Во всех случаях второй глаз (левый) был контрольным. На контрольных глазах мы проводили тампонаду «легким» силиконовым маслом вязкостью 5700 сСт (два кролика из группы) и физиологическим раствором (два кролика из группы).

Все оперативные вмешательства, а также выведение животных из эксперимента выполняли в соответствии с «Правилами обращения с лабораторными животными» [3].

Методика оперативного вмешательства

Подготовка. Анестезия: внутримышечно раствор тиопентала натрия в дозе 2 мг/кг, эфирно-барбитурно 0,5 % раствор проксиметакаина. Мидриаз: эфирно-барбитурно по 1 капле 1 % атропина сульфата и 2,5 % фенилэфрина. Перед проведением оперативного вмешательства эфирно-барбитурно 0,3 % раствор офлоксацина.

Задняя закрытая субтотальная витректомиа (ЗЗСВ) проводилась под контролем операционного микроскопа ОРТОН ОрМи-8 аппаратом КФЭ-01-«МЕДА-НН» (частота 1200 уд/мин, аспирация 150 мм рт. ст.) инструментами 23G и 20G. В полость правого глаза вводили 1,5 мл ПФОС – перфторпергидрофталин. В полость левого глаза (контроль) вводили 1-1,5 мл «легкого» силиконового масла вяз-

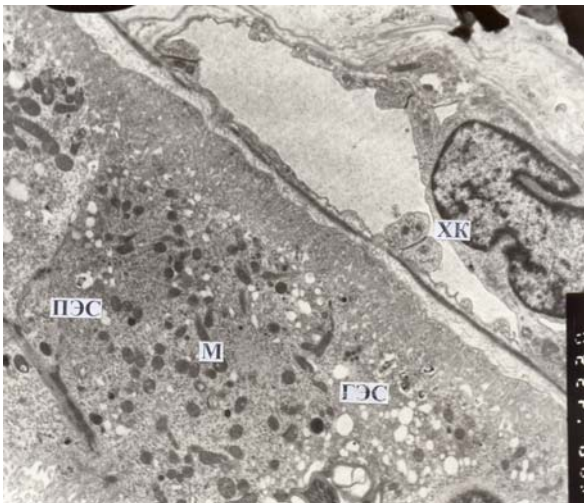


Рис. 1. Ультраструктура сетчатки через семь дней после 30-суточной тампонады ПФОС

Мелкая вакуолизация цитоплазматических структур клеток пигментного эпителия.

Электронная микрофотография. X 4000.

Условные обозначения: ПЭС – пигментный эпителий сетчатки, ХК – хориокапилляр, ГЭС – гладкая эндоплазматическая сеть, М – митохондрия

костью 5700 сСт, либо физиологический раствор. После завершения витректомии в конъюнктивальную полость закладывали мазь 0,3 % офлоксацина.

Завершение тампонады осуществлялось после проведения подготовки описанной выше. Выведение ПФОС и «легкого» силикона выполняли под контролем операционного микроскопа ОРТОН: ОрМи-8 аппаратом КФЭ-01-«МЕДА-НН» (аспирация 150 мм рт. ст.). На глазах с проведением тампонады физиологическим раствором осуществляли замену физраствора.

Для ЭМИ кусочки ткани сетчатки кролика (нижние сегменты сетчатки при тампонаде ПФОС и «тяжелым» силиконовым маслом и верхние сегменты при тампонаде «легким» силиконовым маслом вязкостью 5700 сСт: фиксировали в 2,5 % растворе глютаральдегида на фосфатном буфере при значении pH – 7,4 с последующей дофиксацией 1 % раствором осмиевой кислоты при том же pH буферного раствора. Затем образцы обезживались в спиртах восходящей крепости. Пропитывание материала и его заключение производилось в смеси эпон-аралдит. Затем ультратонкие срезы контрастировались по методике двойного контрастирования, принятого в электронной микроскопии. Материал изучался под электронным микроскопом ПЭМ-100-01.

Результаты исследования и их обсуждение.

Реакция элементов сетчатки на 30-суточную тампонаду ПФОС

1-ая группа. Спустя семь суток после 30-суточной тампонады ПФОС ультраструктура пигментного эпителия сетчатки не отличается от нормальной, за исключением единичных клеток, в которых наблюдается вакуолизация цитоплазматических структур (рис. 1).

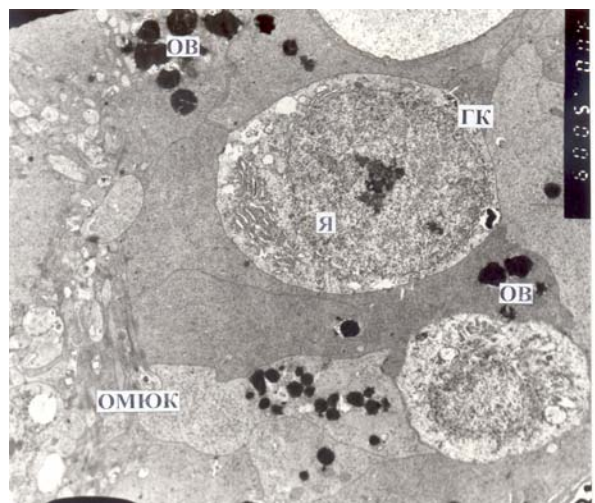


Рис. 2. Ультраструктура сетчатки через семь дней после 30-суточной тампонады ПФОС

Крупные осмофильные включения в цитоплазме отростков мюллеровских клеток у внутренней пограничной мембраны.

Электронная микрофотография. X 3000.

Условные обозначения: ГК – ганглиозная клетка, Я – ядро, ОМЮК – отростки мюллеровских клеток, ОБ – осмофильные включения

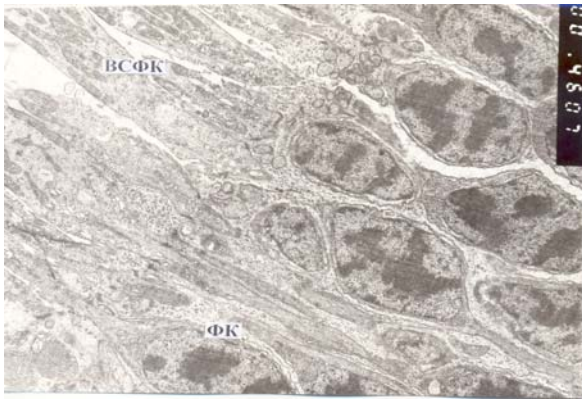


Рис. 3. Ультраструктура сетчатки через 14 дней после 30-суточной тампонады ПФОС

Область ядер фоторецепторных клеток без изменений.

Электронная микрофотография. X 3000.

Условные обозначения: ФК – фоторецепторная клетка, ВСФК - внутренние сегменты фоторецепторных клеток

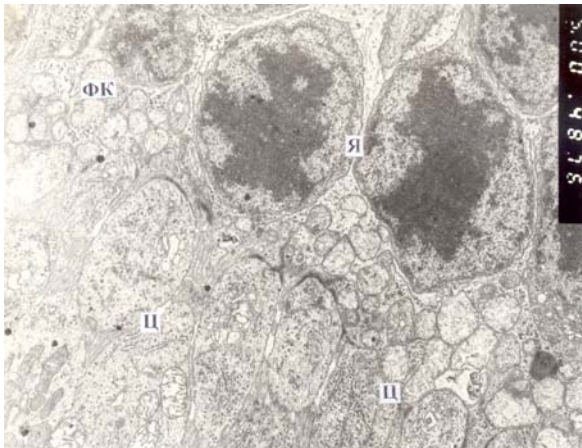


Рис. 5. Ультраструктура сетчатки через семь дней после 30-суточной тампонады силикона

Структура цитоплазмы и ядер фоторецепторных клеток в нормальном состоянии.

Электронная микрофотография. X 5000.

Условные обозначения: ФК – фоторецепторная клетка, Ц – цитоплазма, Я – ядро

Фоторецепторные клетки (ФК) в этот срок без видимых изменений. Нейроны и нервные структуры внутренних слоёв сетчатки также без изменений. В цитоплазме отростков мюллеровских клеток (МЮК) у внутренней пограничной мембраны (ВПМ) встречаются осмиофильные включения, состоящие из мелких гранул, что отличает структуру МЮК от нормальной (рис. 2).

2-ая группа. Спустя 14 суток ультраструктура клеток, пигментный эпителий сетчатки (ПЭС) практически без изменений. ФК и нейроны остальных слоёв сетчатки выглядят нормальными (рис. 3).

В отростках МЮК у ВПМ также как и в предыдущем сроке, наблюдаются включения осмиофильных гранулярных скоплений.

3-ья группа. Спустя 30 суток после завершения тампонады изучаемые структуры сетчатки не отличаются от нормальных.

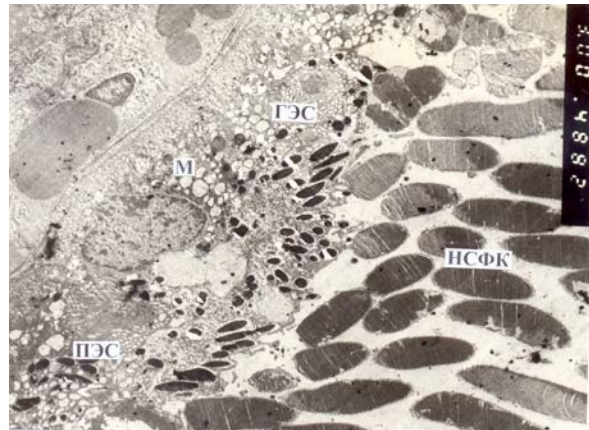


Рис. 4. Ультраструктура сетчатки через семь дней после 30-суточной тампонады силикона.

Мелкая вакуолизация отдельных внутриклеточных структур клетки пигментного эпителия сетчатки.

Электронная микрофотография. X 3000.

Условные обозначения: ПЭС – пигментный эпителий сетчатки, ГЭС – гладкая эндоплазматическая сеть, М – митохондрия, НСФК - наружные сегменты фоторецепторных клеток

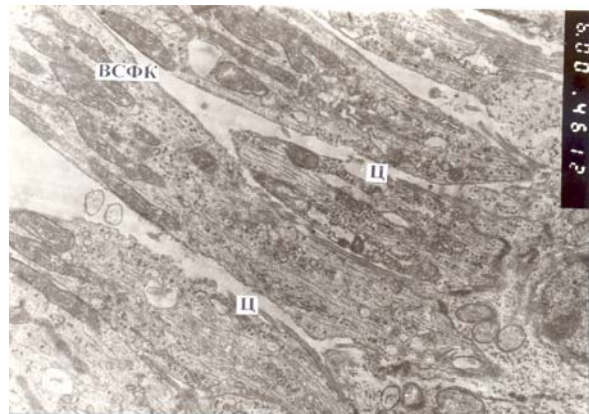


Рис. 6. Ультраструктура сетчатки через 14 дней после 30-суточной тампонады ПФОС

Внутренние сегменты фоторецепторных клеток в нормальном состоянии.

Электронная микрофотография. X 6000.

Условные обозначения: ВСФК - внутренние сегменты фоторецепторных клеток, Ц - цитоплазма

Реакции элементов сетчатки на 30-суточную тампонаду «легким» силиконовым маслом вязкостью 5700 сСт.

1-ая группа. Спустя семь суток после удаления силиконового масла из витреальной полости глаза ультраструктура большей части изученных клеток ПЭС без видимых изменений; часть же содержит в цитоплазме различных размеров везикулы и более крупные электронно-прозрачные полости, т.е. наблюдаются признаки незначительных гидропических изменений цитоплазматических структур. ФК без изменений, как и нейроны других слоёв сетчатки. В цитоплазме отростков МЮК у ВПМ наблюдаются округлые включения, состоящие из осмиофильных плотно уложенных гранул, окружённых

електронно-прозорним ободком. Эти включения часто более крупные, чем это наблюдалось в материале с тампонадой ПФОС (рис. 4, 5).

2-ая группа. Спустя 14 суток после завершения тампонады в данном материале грубая отслойка сетчатки, связанная, по-видимому, с манипуляциями во время осуществления эксперимента. С этим связаны и гидропические изменения и разрывы клеток ПЭС, а также отрыв от ПЭС наружных сегментов фоторецепторных клеток (НСФК). ФК и нейроны сетчатки, в целом, не изменены.

3-ья группа. Спустя 30 суток после завершения тампонады изученные ультраструктуры элементов сетчатки не отличаются от нормальных.

Реакции элементов сетчатки на 30-суточную тампонаду физиологическим раствором.

1,2,3-ья группы. Все изученные элементы сетчатки через 7,14 и 30 суток визуально нормальны (рис. 6).

Таким образом, электронно-микроскопические исследования показали, что после 30-суточной тампонады ПФОС и «легким» силиконом через семь суток наблюдаются лёгкие реактивные изменения гидропического характера в цитоплазме ряда клеток ПЭС. Спустя 14 и 30 суток после окончания тампонады структура изученных элементов сетчатки близка к нормальной. Однако следует отметить, что на 7-14-ые сутки в цитоплазме отростков МЮК у ВПМ выявлены округлые образования содержащие скопления осмиофильных гранул. Это могут быть вторичные лизосомы, которые утилизируют чужерод-

ный материал внутриклеточно. Имеет ли это отношение к утилизации веществ, использованных для тампонады, сказать трудно. При использовании физ. раствора ультраструктура изученных элементов сетчатки, практически, не изменена.

Вывод

Поскольку влияние 30-суточной тампонады перфторорганическим соединением не оказывает значительного влияния на ультраструктурное строение сетчатки и сопоставимо со стандартным широко используемым тампонирующим веществом – «легким» силиконовым маслом он может рассматриваться как кандидат для кратковременной тампонады.

Перспективы дальнейших исследований.

Применение перфторорганического соединения с целью длительной тампонады представляет интерес и требует дальнейших исследований.

Литература

1. Brett D. Short-term intraocular tamponade with perfluorocarbon heavy liquid // D. Brett, Bourke Robert // Br. J. Ophthalmol. – 2011. – № 5. – P. 694-698.
2. Mackiewicz J. Effect of gravity in long-term vitreous tamponade: in vivo investigation using perfluorocarbon liquids and semi-fluorinated alkanes / J. Mackiewicz, K. Maaijwee, C. Luke // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. – 2007. – № 245. – P. 665-675.
3. Norman H.J. Requirements of bioethics of the Helsinki declaration about ethical regulation of medical researches / H.J. Norman // Хроника ВОЗ. – 1985. – Т. 39, № 3. – С. 3-9.
4. The effect of specific gravity of perfluorocarbon liquid on the retina after experimental vitreous substitution / U. Stolba, K. Krepler, M. Velikay-Parel, S. Binder // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. – 2007. – № 11. – P. 931-936.

ВПЛИВ ТРИДЦЯТИДЕННОЇ ТАМПОНАДИ ПЕРФТОРОРГАНІЧНИМИ СПОЛУКАМИ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ СІТКІВКИ КРОЛИКА

Д.В. Жмурик¹, Н.Е. Думброва², Н.І. Молчанюк², М.В. Мілієнко¹

Резюме. Експериментальне дослідження було проведено на 12 кроликах (24 ока). Всім тваринам була виконана задня закрыта субтотальна вітректомія з наступною 30-денною тампонадою перфторорганічною сполукою (ПФОС) – праве око, «легким» силіконом або фізрозчином (ліве око). Електронно-мікроскопічне дослідження було проведено після завершення тампонади 7, 14 і 30 днів. Після 30-денної тампонади використаними сполуками структури сітківки відповідають однаковими змінами. Проте ці зміни реактивні, а не пошкоджувальні і мають оборотний характер. ПФОС можуть розглядатися як кандидати для короткочасної тампонади.

Ключові слова: ультраструктура, сітківка, перфторорганічні сполуки, «легкий» силікон.

EFFECT OF THIRTY DAY TAMPONADE WITH PERFLUORORGANIC COMPOUNDS ON RABBIT'S RETINAL ULTRASTRUCTURE

D.V. Zhmuryk¹, N.E. Dumbrova², N.I. Molchaniuk², M.V. Miliienko¹

Abstract. Experimental study was performed on 12 (24 eyes) rabbits. All animals underwent back closed subtotal vitrectomy, followed by a 30-day tamponade perfluororganic compound (PFOC) of the right eye, lightweight silicone or saline (left eye). Electron microscopic examination was carried out after 7, 14 and 30 day tamponade. After a 30-day tamponade with the compounds, the structures of the retina respond with similar changes. However these changes were reactive, not damaging, and they are reversible. The compounds can be used for momentary tamponade.

Key words: ultrastructure, retina, perfluororganic compounds, lightweight silicone.

¹Municipal clinical ophthalmology hospital "Eye microsurgery center" (Kyiv)

²SI "V.P. Filatov Institute of eye diseases and tissue therapy of NAMS of Ukraine" (Odessa)