

© Жмурик Д.В., Мілієнко М.В.

УДК: 617.735-007.281-089

**Жмурик Д.В., Мілієнко М.В.**

Київська міська клінічна офтальмологічна лікарня "Центр мікрохірургії ока" (проспект Комарова, 3, м. Київ, Україна, 03680)

## ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВПЛИВУ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ СІТКІВКИ ОКА КРОЛИКА ТРИДЦЯТИДЕННОЇ ТАМПОНАДИ ПЕРФТОРОРГАНІЧНОЮ СПОЛУКОЮ І "ЛЕГКОЮ" СИЛІКОНОВОЮ ОЛІЄЮ

**Резюме.** Експериментальне дослідження було проведено на 12 кроликах (24 ока). Всім тваринам була виконана задня закрита субтотальна вітректомія з наступною тридцятиденною тампонадою перфторорганічними сполуками (ПФОС) - праве око і "легким" силіконом (ліве око). Електронно-мікроскопічне дослідження було проведено після завершення тампонади через 7, 14 і 30 днів. Після тридцятиденної тампонади використаними сполуками, структури сітківки відповідають однаковими змінами. Проте ці зміни реактивні, а не пошкоджуючі та мають зворотній характер. ПФОС можуть розглядатися як кандидати для короткочасної тампонади вітреальної порожнини.

**Ключові слова:** ультраструктура, сітківка, перфторорганічні сполуки, легка силіконова олія.

### Вступ

Використання сполук з високою питомою вагою для тампонади вітреальної порожнини - перфторорганічних сполук (ПФОС) могло би розширити покази до оперативного лікування відшарування сітківки різного ґенезу та покращити як анатомічні, так і функціональні результати. ПФОС має питому вагу в середньому в два рази більше води і має важливі для вітреоретинальної хірургії якості, а саме: хімічна та метаболічна інертність; прозорість; висока питома вага (~1,5-1,9 г/см<sup>3</sup>); низька в'язкість та поверхневий натяг; висока відносна щільність (1,94-2,03); близький до оптичних середовищ ока коефіцієнт заломлення.

Вперше в медицині вони були використані в 1966 році [Clark, Gollan, 1966]. З початку вісімдесятих років рідкі ПФОС використовувалися в якості кровозамінників (перфторан). Про перший досвід інтравітреального введення ПФОС було сповіщено Haidt та співавторами у 1982 році [Haidt et al., 1982], з тих пір вони активно використовуються інтраопераційно. Проте, ставлення вітреоретинальних хірургів до короткочасної тампонади вітреальної порожнини ПФОС неоднозначне, залишається відкритим питання про механічну пошкодуючу дію ПФОС [Шкворченко, 1995; Шкворченко, 1999; Chang et al., 1991].

Автори вивчали дію ПФОС на сітківку ока експериментальних тварин за допомогою електроретинографії, світової на електронної мікроскопії, які проводились без завершення тампонади, або на різних строках після виведення ПФОС з вітреальної порожнини з одним певним строком тампонади [Шкворченко, 1999; Bryan et al., 1994; Flores-Aguilar, 1995; Mackiewicz et al., 2007; Orzalesi et al., 1998; Zeana, 1999], що на нашу думку не дає можливості оцінити зворотність змін сітківки після тампонади ПФОС та операційної травми.

Актуально було б провести дослідження впливу на ультраструктуру сітківки ока кролика тридцятиденної тампонади в умовах максимально наближених до реальних клінічних з проведенням задньої закритої субтотальної вітректомії (ЗЗСВ), використовуючи для тампонади ПФОС максимального ступеню очистки і з най-

більшою питомою вагою (перфторпергідронафталін - 1,94 г/см<sup>3</sup>). Також доцільно дослідити ультраструктуру сітківки кролика в різні строки після завершення тампонади ПФОС і порівняти ці данні з результатами, отриманими після тампонади "легкою" силіконовою олією (в'язкістю 5700 сСт).

**Мета** експериментального дослідження - порівняння впливу тампонади ПФОС і "легкої" силіконової олії (30 днів) на ультраструктуру сітківки ока кролика в динаміці шляхом електронно-мікроскопічного дослідження (ЕМД) на різних строках після завершення тампонади (7, 14 та 30 днів).

### Матеріали та методи

Експериментальне дослідження проводилось на 12 кроликах самцях (24 ока) породи шиншила масою 3,5±0,5 кг, у віці 6,5±0,5 місяців. Тампонада ПФОС складала 30 днів.

ЕМД сітківки проводилось всім тваринам на різних строках після завершення тампонади вітреальної порожнини ПФОС (праве око) та "легкою" силіконовою олією (ліве око). Всі тварини після завершення тампонади були розділені на три групи, відповідно до термінів проведення дослідження: перша група (4 кролика) - проведення ЕМД сітківки через 7 днів після завершення тампонади; друга група (4 кролика) - проведення ЕМД сітківки через 14 днів після завершення тампонади; третя група (4 кролика) - проведення ЕМД сітківки через 30 днів після завершення тампонади.

Всі оперативні втручання, а також виведення тварин із експерименту проводились згідно з "Правила поводження з лабораторними тваринами" [Norman, 1985].

**Методика оперативного втручання.** Підготовка. Анестезія: внутрішньом'язово розчин тіопенталу натрія в дозі 2 мг/кг, епібульбарно 0,5% розчин проксиметакайну. Мідріаз: епібульбарно по 1 краплі 1% атропіну сульфата та 2,5 % фенілефрину. Перед проведенням оперативного втручання епібульбарно 0,3% розчин офлаксайна.

ЗЗСВ проводилась під контролем операційного

мікроскопа OPTON OpMi-8 апаратом КФЭ-01-"МЕДА-НН" (частота 1200 уд./хв., аспірація 150 мм рт. ст.) інструментами 23G і 20G. У вітреальну порожнину правого ока вводили 1,5 мл ПФОС - перфторпергідронафталін. В порожнину лівого ока (контроль) вводили 1-1,5 мл "легкої" силіконової олії в'язкістю 5700 сСт. Після завершення вітректомії в кон'юнктивальну порожнину закладали мазь 0,3% офлаксайна.

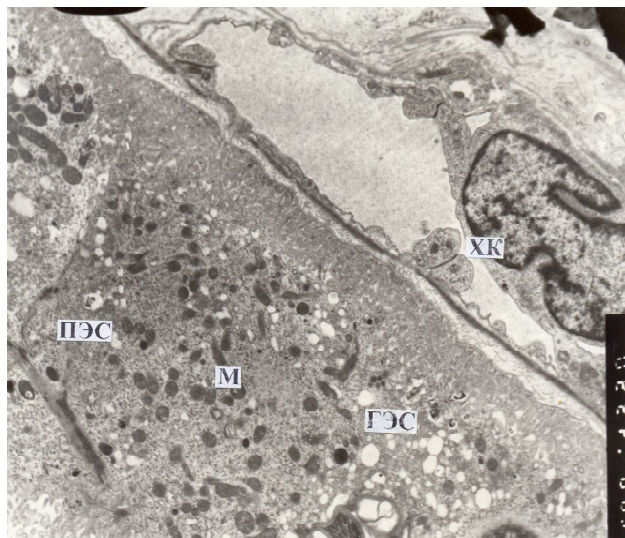
Завершення тампонади здійснювалось після проведення підготовки описаної вище. Виведення ПФОС та силіконової олії виконувалось під контролем операційного мікроскопа OPTON OpMi-8 апаратом КФЭ-01-"МЕДА-НН" (аспірація 150 мм.рт.ст.).

Для ЕМД шматочки тканини сітківки кролика (нижні сегменти сітківки при тампонаді ПФОС і верхні - при тампонаді силіконовою олією) фіксували в 2,5% розчині глютаральдегіда на фосфатному буфері при рН - 7,4 з наступною дофіксацією 1 % розчином осміевою кислотою при тих же значеннях рН буферного розчину. Потім зразки зневоднювали в спиртах зростаючої міцності. Просочування матеріалу та його закладення проводилось в суміші епон-аралдит. Потім ультратонкі зрізи контрастувались по методу Reynolds [Reynoldes, 1963]. Матеріал вивчався під електронним мікроскопом ПЕМ - 100-01.

### Результати. Обговорення

Реакція елементів сітківки на тридцятиденну тампонаду ПФОС.

1 група. Через 7 днів ультраструктура пігментного епітелію сітківки (ПЕС) не відрізняється від нормальної, за винятком поодиноких клітин, в яких спостерігається



**Рис. 1.** Ультраструктура сітківки через 7 днів після 30-добової тампонади ПФОС. Дрібна вакуолізація цитоплазматичних структур клітин пігментного епітелію. Електронна мікрофотографія. Х 4000.

**Примітки:** ПЕС - пігментний епітелій сітківки, ХК - хориокапіляр, ГЭС - гладка ендоплазматична сітка, М - мітохондрія.

вакуолізація цитоплазматичних структур (рис.1). Фоторецепторні клітини (ФК) без змін. Нейрони і нервові структури внутрішніх шарів сітківки також без змін. У цитоплазмі відростків мюллеровських клітин (МЮК) у внутрішній пограничній мембрані (ВПМ) зустрічаються осміофільні включення, які складаються із мілких гранул, що відрізняє структуру МЮК від нормальної (рис.2).

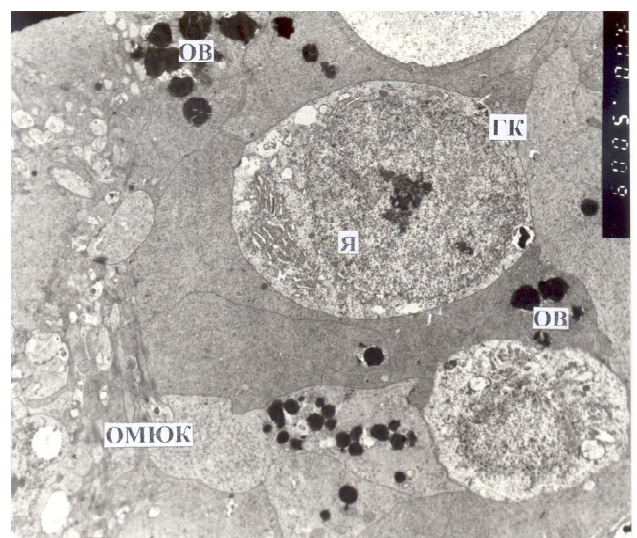
2 група. Через 14 днів ультраструктура клітин ПЕС практично без змін. Стан ФК і нейронів інших шарів сітківки в межах норми (рис. 3, 4). У відростках МЮК у ВПМ також, як і в попередньому дослідженні, спостерігається включення осміофільних гранулярних скупчень.

3 група. Через 30 днів після завершення тампонади досліджувані структури сітківки не відрізняються від нормальних.

Реакція елементів сітківки на тридцятиденну тампонаду "легкою" силіконовою олією.

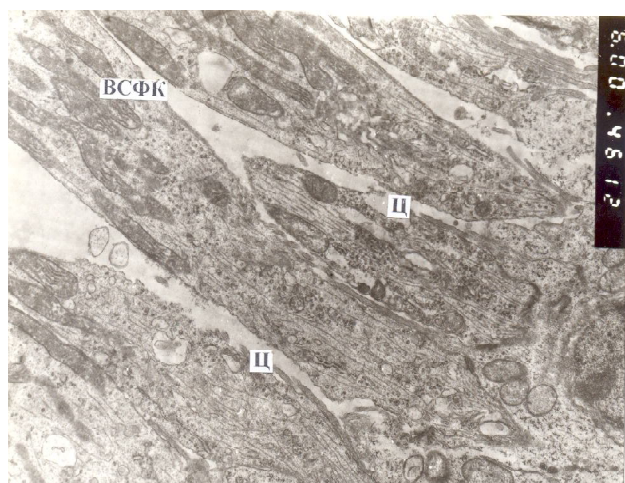
1 група. Через 7 днів ультраструктура більшої частини досліджуваних клітин ПЕС без видимих змін; проте частина містить в цитоплазмі різних розмірів везикули і більш великі електронно-прозорі порожнини, тобто спостерігаються ознаки незначних гідропічних змін цитоплазматичних структур. ФК без змін, як і нейрони інших шарів сітківки. В цитоплазмі відростків МЮК у ВПМ спостерігаються круглі включення, які складаються із осміофільних щільно складених гранул, із електронно-прозорим обідком. Ці включення більші, ніж це спостерігалось в матеріалі з тампонадою ПФОС (рис. 5, 6).

2 група. Через 14 днів після завершення тампонади, в даному матеріалі грубе відшарування сітківки, пов'язане з маніпуляціями під час проведення експерименту. З цим пов'язані і гідропічні зміни, і розриви клітин



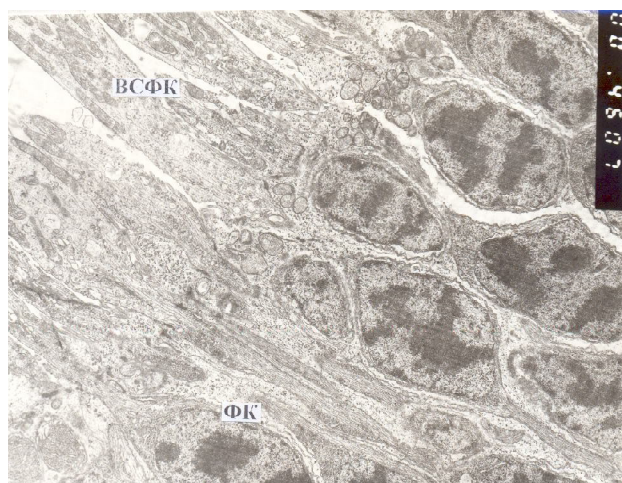
**Рис. 2.** Ультраструктура сітківки через 7 днів після 30-добової тампонади ПФОС. Великі осміофільні включення в цитоплазмі відростків мюллеровських клітин у внутрішній прикордонній мембрані. Електронна мікрофотографія. Х 3000.

**Примітки:** Я - ядро, ГК - гангліозна клітина, ОМЮК - відростки мюллеровських клітин, ОБ - осміофільні включення.



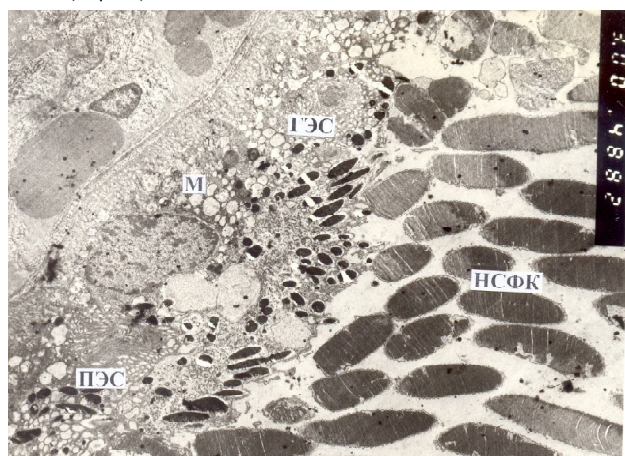
**Рис. 3.** Ультраструктура сітківки через 14 днів після 30-добової тампонади ПФОС. Внутрішні сегменти фоторецепторних клітин в нормальному стані. Електронна мікрофотографія. X 6000.

**Примітки:** ВСФК - внутрішні сегменти фоторецепторних клітин, Ц - цитоплазма.



**Рис. 4.** Ультраструктура сітківки через 14 днів після 30-добової тампонади ПФОС. Область ядер фоторецепторних клітин без змін. Електронна мікрофотографія. X 3000.

**Примітки:** ФК - фоторецепторна клітина, ВСФК - внутрішні сегменти фоторецепторних клітин, Я - ядра.



**Рис. 5.** Ультраструктура сітківки через 7 днів після 30-добової тампонади силікону. Дрібна вакуолізація окремих внутрішньоклітинних структур клітини пігментного епітелію сітківки. Електронна мікрофотографія. X 3000.

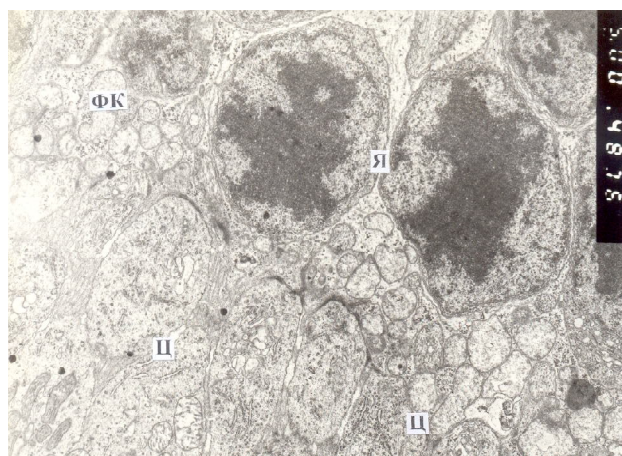
**Примітки:** ПЕС - пігментний епітелій сітківки, ГЭС - гладка ендоплазматична сітка, М - мітохондрія, НСФК - зовнішні сегменти фоторецепторних клітин.

ПЕС, а також відрив від ПЕС зовнішніх сегментів ФК, ФК і нейрони сітківки, в цілому, не змінені.

3 група. Через 30 днів після завершення тампонади досліджували ультраструктури елементів сітківки не відрізняються від нормальних.

### Висновки та перспективи подальших розробок

1. ЕМД показали, що після тридцятиденної тампонади ПФОС і "легкою" силіконовою олією через 7 днів спостерігаються реактивні зміни гідропічного характеру в цитоплазмі ряду клітин ПЕС. Через 14 і 30 днів після закінчення тампонади структура досліджуваних клітин близька до нормальної. Проте варто відмітити,



**Рис. 6.** Ультраструктура сітківки через 7 днів після 30-добової тампонади силікону. Структура цитоплазми і ядер фоторецепторних клітин в нормальному стані. Електронна мікрофотографія. X 5000.

**Примітки:** ФК - фоторецепторна клітина, Ц - цитоплазма, Я - ядро.

що через 7-14 днів в цитоплазмі відростків МЮК у ВПМ виявлені круглі утворення, які містять скупчення осміофільних гранул. Це можуть бути вторинні лізосоми, які утилізують чужорідний матеріал внутрішньоклітинно. Чи має це відношення до утилізації речовин, які використовувались для тампонади, сказати важко.

Оскільки дія тридцятиденної тампонади ПФОС не має значного впливу на ультраструктуру будову сітківки і співпадає з дією стандартної широко використовуваної речовини - "легкої" силіконової олії, вона може розглядатися як кандидат для короткочасної тампонади.

Використання ПФОС з метою тривалої тампонади потребує подальших досліджень.

## Список літератури

- Шкворченко Д. О. Комплексное хирургическое лечение отслоек сетчатки, осложненных гигантскими разрывами и отрывами от зубчатой линии, с применением жидких перфторорганических соединений : дис. ... канд. мед. наук: 14.00.08 / Шкворченко Д. О. - М., 1995. - 132 с.
- Экспериментально - клиническое обоснование применения витреопресса для краткосрочного послеоперационного тампонирования в витреоретинальной хирургии / Д. О. Шкворченко, О. В. Каштан, К. Н. Макаров, Т. И. Ронкина // Перфторорганические соединения в биологии и медицине: сб. науч. трудов. - Пушино, 1999. - С. 186-192.
- Brett D. Short-term intraocular tamponade with perfluorocarbon heavy liquid // D. Brett, R. Bourke // Br. J. Ophthalmol. - 2011. - № 5. - P. 694-698.
- Clark L. C. Jr. Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure / L.C. Jr. Clark, F. Gollan // Science. - 1966. - № 3730. - P 1755-1756.
- Experimental short-term tolerance to perfluorodecalin in the rabbit eye: a histopathological study / N. Orzalesi, L. Migliavacca, F. Bottoni, S. Miglior // Curr. Eye Res. - 1998. - № 8. - P. 828-835.
- Experimental studies of tolerance to intravitreal perfluoro-n-octane liquid / S. Chang, J.R. Sparrow, T. Iwamoto [et al.] // Retina. - 1991. - № 4. - P. 367-374.
- Experimental study on the effects of a replacement of the vitreous body with perfluorotributylamine on the rabbit eye / H. Terauchi, S. Okinami, Z. Kozaki [et al.] // Nihon Ganka Gakkai Zasshi. - 1989. - №3. - P. 294-301.
- Experimental tolerability of perfluorodecalin in prolonged intraocular tamponade / F. Devin, T. Jourdan, J. B. Saracco, A. Lucciani // J. Fr. Ophthalmol. - 1995. - № 4. - P. 268-274.
- Haidt S. J. Liquid perfluorocarbon replacement of the eye / S. J. Haidt, L. C. Clark, J. Ginsberg // Invest. ophthalmol. Vis. Sci. - 1982. - № 22. - P. 233.
- Intraocular tolerance of perfluorooctylbromide (perflubron) / M. Flores-Aguilar, D. Munguia, E. Loeb [et al.] // Retina. - 1995. - № 1. - P. 3-13.
- 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.
- 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.
- Perfluorohexyloctane as a long-term vitreous tamponade in the experimental animal. Experimental perfluorohexyloctane substitution / D. Zeana, J. Becker, R. Kuckelkorn, B. Kirchhof // Int Ophthalmol. - 1999. - № 23. - P. 17-24.
- Reynoldes E. S. The use of lead citrate at high pH an electronopaque stain in electron microscopy / E. S. Reynoldes // I. of Cell Biol. - 1963. - Vol. 17. - P. 208-212.
- Shepard B. J. Experimental vitreous replacement with perfluorotri-n-propylamine / B. J. Shepard, S. M. Friedman, N. Robert [et al.] // Arch. Ophthalmol. - 1994. - № 122. - P. 1098-1102.

**Жмурик Д.В., Миленко М.В.**

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЛИЯНИЯ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА КРОЛИКА ТРИДЦАТИДНЕВНОЙ ТАМПОНАДЫ ПЕРФТОРОРГАНИЧЕСКИМ СОЕДИНЕНИЕМ И "ЛЕГКИМ" СИЛИКОНОВЫМ МАСЛОМ**

**Резюме.** Экспериментальное исследование было проведено на 12 кроликах (24 глаза). Всем животным была выполнена задняя закрытая субтотальная витректомиа с последующей тридцатидневной тампонадой перфторорганическим соединением (ПФОС) - правый глаз и "легким" силиконовым маслом (левый глаз). Электронно-микроскопическое исследование было проведено после завершения тампонады через 7, 14 и 30 дней. После тридцатидневной 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 витреальной полости.

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

**Zhmuryk D.V., Milienko M.V.**

**COMPARISON OF EFFECT ON ULTRASTRUCTURE OF A RETINA OF RABBITS 30 DAYS VITREOUS REPLACEMENT OF PERFLUOROCARBON LIQUID AND SILICONE OIL**

**Summary.** Experimental study was performed on 12 (24 eyes) rabbits. All animals were made back closed subtotal vitrectomy with the following thirty days tamponade with perfluorocarbon liquid - the right eye and "easy" silicone (left eye). Electron microscopic study was conducted after completion of tamponade through 7, 14 and 30 days. After thirty day tamponade with used compounds, the structure of the retina correspond to the same changes. However, these changes are reactive, not damaging and are reversible. Perfluorocarbon liquid may be considered as candidates for short-term tamponade of vitreous cavity.

**Key words:** ultrastructure, retina, perfluorocarbon liquid, light silicone oil.

Стаття надійшла до редакції 18.12.2014 р.

Жмурик Дмитро Васильович - врач-офтальмолог відділення вітреоретинальної хірургії Київської міської клінічної офтальмологічної лікарні "Центр мікрохірургії ока"; +38 067 758-89-79; vizus@ukr.net

Мілієнко Марія Валентинівна - врач-офтальмолог НВЦ "Лазерних методів лікування ока" Київської міської клінічної офтальмологічної лікарні; +38 063 875-47-55; milienko.m@yandex.ua