

А.Н. Куликов, Т.А. Брагина, С.В. Лепнева и Э.В. Бойко

УЛЬТРАСТРУКТУРА ВОЛОКОН ЗРИТЕЛЬНОГО НЕРВА КРОЛИКОВ ПРИ ИНТРАВИТРЕАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ ПЕРФТОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Кафедра офтальмологии (нач. — проф. Э.В. Бойко) Военно-медицинской академии, Санкт-Петербург

В эксперименте на кроликах ($n=14$) изучена ультраструктура миелиновых волокон зрительного нерва после интравитреального применения перфтороктилбромида (ПФОБ) и перфтордекалина (ПФД) в течение 30 сут. После интраокулярного введения ПФОБ изменения ультраструктуры волокон зрительного нерва имели преимущественно реактивный характер. В осевых цилиндрах миелиновых волокон наблюдались набухание митохондрий и частичное разрушение их крист. При использовании ПФД выявлялись не только реактивные, но и значительные дегенеративные изменения: разрушение органелл и миелиновой оболочки, а также дезинтеграция цитоскелета аксонов. Следовательно, изменения при применении ПФОБ были выражены в меньшей степени, чем при использовании ПФД. Поэтому ПФОБ является более перспективным для использования в качестве офтальмологического имплантата.

Ключевые слова: зрительный нерв, аксоны, электронная микроскопия, фторуглероды, искусственные имплантаты.

Перфторорганические соединения (ПФОС) широко используются в офтальмологии для тампонады стекловидной камеры при хирургическом лечении наиболее тяжелых повреждений и заболеваний заднего отдела глаза. Однако большинство имплантатов и лекарственных средств при интравитреальном применении оказывают негативное воздействие на окружающие ткани [3–7]. Поэтому поиск соединений, пригодных не только для интраоперационной, но и для краткосрочной послеоперационной тампонады стекловидной камеры глаза, является актуальной задачей.

По данным электрофизиологических исследований [3], новый имплантат перфтороктилбромид (ПФОБ) в течение 2 нед интравитреального применения почти не нарушает функциональную активность сетчатки и зрительного нерва (ЗН) по сравнению с известным соединением — перфтордекалином (ПФД) и поэтому является перспективным для офтальмохирургии.

Электронная микроскопия, благодаря своей информативности, является одним из основных методов исследования экспериментальной офтальмохирургии [1, 3, 6, 7]. Поэтому именно этот метод мы выбрали для изучения морфологических изменений, определяющих выявленное ранее умеренное угнетение функциональной активности ганглионарных нейронов [3]. При этом в доступной литературе отсутствуют данные об изменениях ультраструктуры ЗН при тампонаде стекловидной камеры глаза перфторорганическими имплантатами, хотя атрофия волокон ЗН считается неспецифическим исходом разнообразных патологических процессов [2].

Цель данного исследования — проанализировать изменения ультраструктуры аксонов ЗН при интравитреальном применении двух ПФОС: ПФОБ и ПФД.

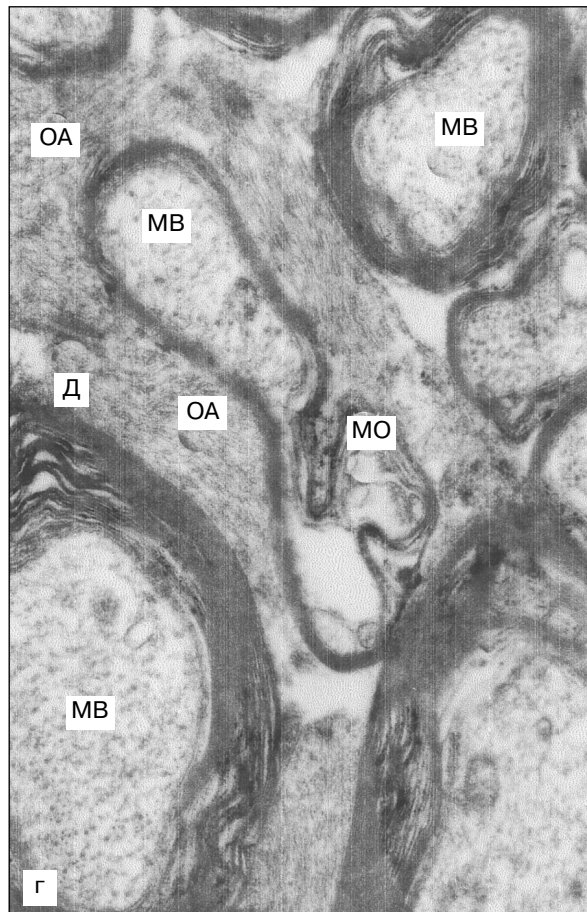
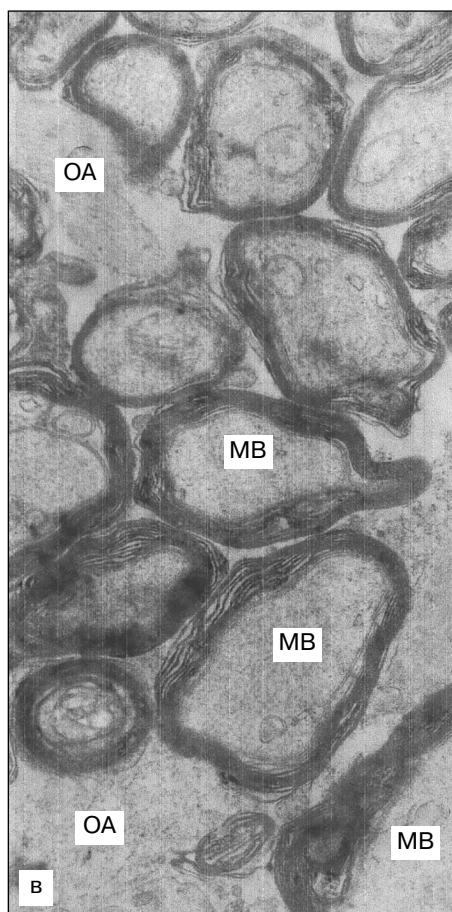
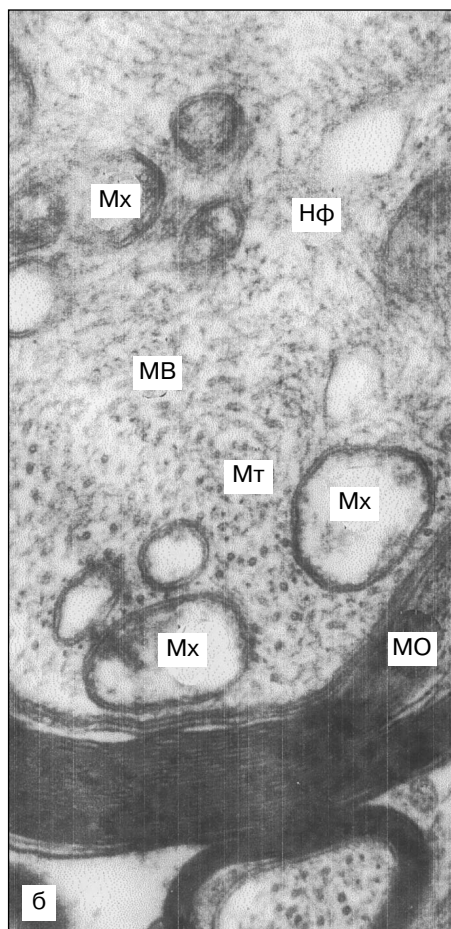
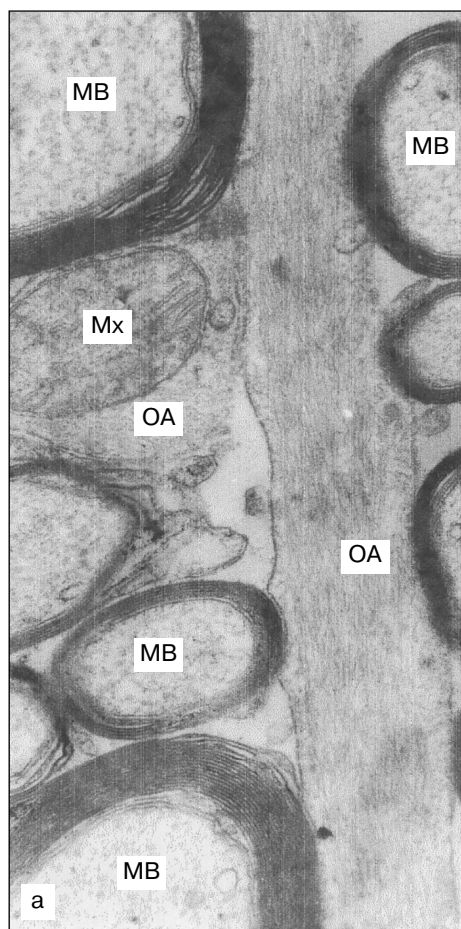
Материалы и методы. Работа выполнена на 14 молодых кроликах породы шиншилла обоего пола массой 2–3 кг. Все эксперименты на животных осуществляли в соот-

ветствии с «Правилами проведения работы с использованием экспериментальных животных». С помощью электронной микроскопии исследовали ЗН интактных животных, а также кроликов контрольной и двух экспериментальных групп. Материал брали на 30-е сутки после частичной витрэктомии и замены иссеченного стекловидного тела 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия (контроль), равным объемом ПФОБ или ПФД (1-я и 2-я экспериментальные группы). Использовали отечественные ПФОС производства РНЦ «Прикладная химия» (Санкт-Петербург).

Фрагменты орбитальной части ЗН фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида на 0,1М какодилатном буфере и дофиксировали в забуференном 1% растворе четырехоксида осмия, дегидратировали в этаноле постепенно возрастающей концентрации и заливали в аралдит. Срезы изготавливали с помощью ультратома LKB-V (LKB, Швеция). Полутонкие срезы, окрашенные метиленовым синим, просматривали под световым микроскопом и использовали их для ориентировки при последующей прицельной заточке блока. Ультратонкие срезы на сетках-подложках контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу, изучали в электронном микроскопе Hitachi H-300 (Hitachi, Япония).

Результаты исследования. В норме миелиновые нервные волокна различной толщины, которые содержат аксоны ганглионарных (мультиполярных) клеток сетчатки, располагаются в ЗН пучками (рисунок, а). Нервное волокно на поперечном срезе имеет округлую форму. Миелиновая оболочка может быть различной толщины, в зависимости от количества образующих ее пластинок. В осевом цилиндре содержатся митохондрии, цистерны агранулярной эндоплазматической сети, а также микротрубочки и нейрофиламенты — цитоскелет аксона.

В аксоплазме части миелиновых нервных волокон ЗН животных контрольной группы наблюдается набухание митохондрий с просветлением их матрикса и частичным разрушением крист. Даже в пределах одного осевого цилиндра, наряду с измененными,



имеются митохондрии, сохраняющие нормальную структуру (см. рисунок, б). Другим признаком, отличающим ЗН кроликов контрольной группы от такового в норме, является редко регистрируемое появление в аксоплазме нервных волокон единичных небольших вакуолей.

При исследовании поперечных срезов ЗН после замены иссеченного стекловидного тела ПФОБ обнаружено, что морфологические изменения выражены весьма умеренно. Подавляющее большинство нервных волокон не изменено. В немногочисленных осевых цилиндрах наблюдаются набухшие митохондрии с просветленным матриксом и частичным или реже полным разрушением крист. Они встречаются значительно чаще, чем у кроликов контрольной группы. Выявляются волокна, в которых при сохранном осевом цилиндре миелиновая оболочка в отдельных участках подвергается расщеплению, при этом нарушается правильная конфигурация пластинок. В этой экспериментальной группе в ЗН встречаются, хотя и довольно редко, волокна с признаками дегенеративных изменений осевого цилиндра — отсутствовавшие в контроле. Такие структуры обнаруживаются на поперечных срезах в виде небольших групп, состоящих из 2–3 волокон, расположенных вплотную друг к другу и окруженных обширными полями неизмененных нервных волокон. Осевые цилиндры этих волокон характеризуются дезинтеграцией цитоскелета или отсутствием не только микротрубочек и нейрофиламентов, но и других органелл, что сопровождается резким просветлением аксоплазмы. При этом миелиновая оболочка, хотя и сохраняет свою целостность, имеет признаки аномалии — расщепление или слипание пластинок с нарушением их правильной конфигурации (см. рисунок, в).

Морфологические изменения ЗН у кроликов после замены иссеченного стекловидного тела ПФД имеют не только реактивный (как в 1-й экспериментальной группе), но и деструктивный характер. На поперечном срезе ЗН участки с хорошо сохранившимися, практически неизмененными миелиновыми нервными волокнами, перемежаются с пучками дегенеративно-измененных волокон. В осевых цилиндрах таких волокон присутствуют крупные вакуоли, представляющие собой запустевшие вследствие потери крист и набухшие митохондрии, а также резко расширенные цистерны агранулярной эндоплазматической сети (см. рисунок, г). Наблюдается дезинтеграция цитоскелета, при этом исчезают не только микротрубочки, но и нейрофиламенты. В осевых цилиндрах отдельных нервных волокон отмечается полное отсутствие органелл. Патологически изменена и миелиновая оболочка аксонов. Вследствие отека наружные пластинки миелина расщепляются, при этом внутренние — слипаются и деформируются. Некото-

рые нервные волокна изменяют свою конфигурацию, осевой цилиндр при этом деформируется, миелин частично подвергается лизису.

Кроме того, наблюдаются различные стадии и типы дегенеративных изменений нервных волокон. Нередко из элементов цитоскелета в аксонах определяются лишь агглютинированные нейрофиламенты. Внутренние пластинки миелиновой оболочки зачастую преобразованы в везикулярные и вакуолярные образования, а в аксоплазме эндоплазматическая сеть представлена крупными пузырьками. В других волокнах отдельные пластинки миелиновой оболочки не различимы. Иногда от волокон остается лишь электронно-плотная масса, представляющая собой истонченный осевой цилиндр и деградирующую миелиновую оболочку.

Обсуждение полученных данных. Ультраструктура ЗН кроликов контрольной группы через 30 сут после операции изменена, что свидетельствует о значимости хирургической травмы и длительном времени, которое требуется на его реабилитацию. Однако все описанные изменения имели исключительно реактивный характер. В частности, в аксоплазме ограниченного числа нервных волокон отмечено набухание митохондрий с просветлением их матрикса и частичным разрушением крист, а также появление единичных небольших вакуолей. Такие минимальные ультраструктурные изменения, как правило, даже не учитываются исследователями, изучающими токсичность медицинских изделий и лекарственных средств, применяющихся интравитреально [4–7].

Изменения ультраструктуры ЗН у животных после 30 сут интравитреального пребывания ПФОБ были выражены умеренно. Большинство аксонов выглядели практически неизмененными. Осевые цилиндры с реактивными изменениями — набуханием митохондрий и разрушением их крист — встречались чаще, чем в контрольной группе. Дегенеративные изменения: разрушение миелиновой оболочки и дезинтеграция цитоскелета аксонов с разрушением органелл и просветлением аксоплазмы — наблюдались в единичных отростках ганглионарных клеток. Аналогичные умеренные ультраструктурные изменения отмечали в экспериментальных исследованиях при стабилизированной глаукоме [1] и при интравитреальном назначении субпороговых дозировок лекарственных средств [5, 6]. Поэтому по результатам данного экспериментального морфологического исследования и мы считаем 30 сут предельно допустимым сроком для использования ПФОБ. При разработке инструкции по применению этого офтальмологического имплантата в клинической практике целесообразно, по нашему мнению, во избежание осложнений, рекомендовать еще меньшие сроки.

Ультраструктура миелиновых волокон (МВ) зрительного нерва кроликов.

а — МВ интактного кролика, между которыми располагаются отростки астроцитов, заполненные глиофибриллами; б — реактивные изменения в МВ кролика контрольной группы; в — нервные волокна кролика 1-й экспериментальной группы (имплантация в стекловидную камеру перфтороктилбромида); г — нервные волокна кролика 2-й экспериментальной группы (имплантация в стекловидную камеру перфтородекалина). Мх — митохондрия; ОА — отросток астроцита; МО — миелиновая оболочка; Мт — микротрубочки; Нф — нейрофиламенты; Д — десмосома. Ув.: а — 21 000; б — 40 000; в — 16 000; г — 19 000.

Ультраструктура ЗН на 30-е сутки интравитреального пребывания ПФД нарушена значительно более резко. Существенная часть миелиновых нервных волокон подвергаются необратимой трансформации. Часто выявляется не только вакуолизация митохондрий, но и полное разрушение всех органелл аксоплазмы с дезинтеграцией цитоскелета, а также расщепление и даже лизис миелиновой оболочки аксонов. Похожая морфологическая картина наблюдается в ЗН кроликов с экспериментальной глаукомой в далеко зашедшей стадии [1], а также при реализации токсического эффекта от интравитреального применения надпороговых доз антибиотиков [5, 6]. Однако длительная тампонада стекловидной камеры глаза таким офтальмологическим имплантатом, как силиконовое масло, нередко приводит к гораздо более резко выраженным деструктивным изменениям аксонов ЗН [4, 7]. Тем не менее, на основании результатов данного и предшествующих [3] исследований, мы не считаем возможным применение ПФД в клинической практике для послеоперационной интраокулярной тампонады.

Таким образом, изменения ультраструктуры, выявленные на срезах орбитальной части ЗН у животных контрольной и экспериментальных групп, демонстрируют менее выраженное негативное влияние ПФОБ, чем ПФД при интравитреальном применении указанных перфторорганических имплантатов. Следовательно, именно ПФОБ является более перспективным материалом для краткосрочной послеоперационной тампонады стекловидной камеры глаза в офтальмохирургии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванова В.Ф., Михеева Е.А., Карелина В.Е. и Алексеев В.Н. Строение зрительного нерва при экспериментальной глаукоме и некоторых способах ее лечения. *Морфология*, 2000, т. 117, вып. 2, с. 56–61.
2. Кудлачев А.В. и Отеллин В.А. Перспективы клинического использования результатов современных нейроморфологических исследований повреждений и атрофий зрительного нерва. *Морфология*, 2003, т. 123, вып. 3, с. 94–102.
3. Куликов А.Н. Экспериментальное изучение высокочистых жидких перфторорганических соединений при интравитреальном введении: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб., 1997.
4. Budde M. Silicone oil-associated optic nerve degeneration. *Am. J. Ophthalmol.*, 2001, v. 131, № 3, p. 392–394.
5. Mietz H., Prager T., Schweitzer C. et al. Effect of mitomycin C on the optic nerve in rabbits. *Br. J. Ophthalmol.*, 1997, v. 81, №7, p. 584–589.
6. Ng E., Joo M., Au Eong K. et al. Ocular toxicity of intravitreal trovafloxacin in the pigmented rabbit. *Cur. Eye Res.*, 2003, v. 27, № 6, p. 387–393.
7. Saitoh A., Taniguchi H., Gong H. et al. Long-term effect on optic nerve of silicone oil tamponade in rabbits: histological and EDXA findings. *Eye*, 2002, v. 16, № 2, p. 171–176.

Поступила в редакцию 05.04.2006 г.

ULTRASTRUCTURE OF OPTIC NERVE FIBERS IN RABBITS AFTER INTRAVITREAL INFUSION OF PERFLUOROORGANIC COMPOUNDS

A.N. Kulikov, T.A. Bragina, S.V. Lepneva and T.V. Boiko

Ultrastructure of optic nerve myelinated fibers after intravitreal infusion of perfluorooctylbromide (PFOB) and perfluorodecaline (PFD) for 30 days was studied in rabbits (n = 14). After intraocular administration of PFOB, the ultrastructural changes of optic nerve fibers were mainly reactive in nature. Mitochondrial swelling and partial destruction of cristae were detected in the axons. After PFD infusion, the changes were observed that were not only reactive, but highly degenerative, including destruction of organelles and myelin sheath and axon cytoskeleton disintegration. Thus, the changes associated with PFOB were less pronounced than those found after PFD application. Therefore, PFOB is more promising for the use as an ophthalmologic implant.

Key words: *optic nerve, axons, electron microscopy, fluorocarbons, artificial implants.*

Department of Ophthalmology, Military Medical Academy, St. Petersburg.