

Експериментальні дослідження

УДК 617.

Особливості клінічних та ультраструктурних змін сітківки кролика залежно від підвищення дозування й кратності інтравітреального введення мелфалану

Н. Ф. Боброва, докт. мед. наук, професор; Т. А. Сорочинська, канд. мед. наук;
Н. І. Молчанюк, канд. біол. наук; **О. Ю. Братішко**, мол. наук. співр.

ДУ «Інститут очних
хвороб і тканинної
терапії ім. В.П. Філатова
НАМН України»;
Одеса (Україна)

Мета. Вивчити особливості клініко-ультраструктурних змін сітківки та судинної оболонки кролів у разі збільшення дози й частоти інтравітреального введення мелфалану.

Матеріал і методи. Клініко-електронну мікроскопію (ЕМ) проводили на 13 очах 7 кролів породи шиншила одного віку (5–6 місяців) і маси (2,5–3 кг). Усі очі було поділено на 5 груп залежно від режиму інтравітреального введення мелфалану: 1 група (4 ока) – по 5 мкг 3 рази; 2 група (2 ока) – по 10 мкг 2 рази; 3 група (2 ока) – по 20 мкг 2 рази; 4 група (3 ока) – по 30 мкг 2 рази, 5 група (2 ока) – по 40 мкг 2 рази. Інтервал між інтравітреальним введенням мелфалану в усіх групах становив 1 місяць. Енуклеацію проводили через 4 тижні після останньої ін'єкції в усіх групах.

Результати. Перша група – зміни очного дна поодинокі невеликі ділянки тонкої депігментації, які залишаються незмінними протягом усього періоду спостереження. ЕМ виявила таке: зовнішні сегменти фоторецепторних клітин (ФК) утворюють зруйновані диски, фрагменти зовнішніх шарів, розриви плазмолемати тощо; нервові елементи інших відділів сітківки без змін. У другій групі – більш виражені зміни очного дна, які децю посилювалися під час кожної повторної ін'єкції. ЕМ виявила позаклітинні пошкодження в зовнішньому та внутрішньому сегментах ФК, вогнища некрозу нервової тканини. третя група – перерозподіл пігменту сітківки, що посилюється й збільшується після повторних ін'єкцій. ЕМ показала таке: клітини пігментного епітелію сітківки із різним ступенем патології аж до їх розпаду, пігмент, виражений гліоз клітин Мюлера. Четверта і п'ята групи – широкі ділянки інтенсивної депігментації, які збільшилися з наступною шкідливою ін'єкцією до майже повного злиття, що призвело до повної зміни кольору сітківки. ЕМ виявила таке: змінені пігментні клітини у внутрішніх шарах сітківки; зовнішній і внутрішній шари ФК відсутні, їх розташування заповнене глієм; внутрішній сегмент ФК також пронизаний гіпертрофованими відростками гліальних клітин; гангліозні клітини з ознаками дистрофічних змін; у судинній оболонці майже повна деструкція хоріокапілярів, ендотелій стінки хоріоїдальних судин має елементи деструкції.

Висновок. Експериментально встановлено, що багаторазове введення мелфалану в різних дозах не спричинило загальнотоксичної дії, а також негативного впливу на передній відділ ока та оптичні середовища піддослідних тварин. Клінічні й ультраструктурні зміни сітківки кроликів залежать від дози препарату: ін'єкція 5 і 10 мкг є безпечною, спричиняючи мінімальні зміни лише в зовнішніх шарах сітківки. Вищі дози мелфалану (20–30 мкг) варто вводити з обережністю: виражені токсичні зміни в сітківці та хоріокапілярному шарі з різним рівнем їх дегенерації, аж до гліозу й некрозу, через порушення живлення сітківки та судинної оболонки.

Ключові слова:

ретинобластома,
інтравітреальна хіміотерапія,
мелфалан

Актуальність. Одним із широко застосовуваних органозберігаючих методів лікування внутрішньоочної ретинобластоми (РБ) сьогодні є інтравітреальна (ІВ) хіміотерапія (ХТ) цитостатиком мелфалан, основними перевагами якої є відсутність загальнотоксичного впливу на організм дитини й точне дозування препарату, що вводиться. [1, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 13, 16]. У

попередніх експериментальних дослідженнях [2] встановлено, що після одноразової ІВ ін'єкції мелфалану в дозуваннях 5–40 мкг виникали різні зміни сітківки кролика залежно від дози препарату.

З огляду на необхідність проведення в клініці повторних неодноразових ІВ ін'єкцій мелфалану для досягнення повного регресу вогнищ РБ та вітреальних клонів, експериментальні дослідження були продовжені.

Мета. Вивчити особливості клінічних та ультраструктурних змін сітчастої й судинної оболонок кролика в разі підвищення дози та кратності інтравітреальних введень (далі – ІВВ) мелфалану.

Матеріал і методи

Проведено клінічні й електронно-мікроскопічні дослідження 13 очей 7 кроликів породи шиншила одного віку (5–6 місяців) і ваги (2,5–3 кг). Під час дослідження та виведення тварин з експерименту дотримувалися нормативів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для наукових експериментів чи інших наукових цілей (Страсбург, 1986), а також Законів України «Про захист тварин від жорсткого поводження» № 1759-VI, № 3447-IV. Тварин виводили з експерименту шляхом створення повітряної емболії під загальною анестезією 10% розчином тіопенталу з розрахунком на вагу кролика (1 мл на кг маси тіла).

Виділено п'ять груп залежно від режиму ІВВ мелфалану: 1 група (4 ока) – по 5 мкг 3 рази; 2 група (2 ока) – 10 мкг 2 рази; 3 група (2 ока) – 20 мкг 2 рази; 4 група (3 ока) – 30 мкг 2 рази, 5 група (4 ока) – 40 мкг 2 рази. Інтравітреальна ін'єкція проводилася за стандартною, апробованою нами раніше методикою [3]. Інтервал між ІВВ мелфалану в усіх групах становив 1 місяць. Огляди здійснювалися наступного дня, на 3, 7 добу й кожного наступного тижня після операції.

Через 4 тижні після останньої ін'єкції в усіх групах кроликів виконана енукеція. Забір матеріалів для електронної мікроскопії та дослідження ультраструктури сітківки проводилися за загальноприйнятою методикою [2; 12] під електронним мікроскопом ПЕМ-100-01.

Результати

Клінічні результати. Інтравітреальні введення мелфалану не чинили загального токсичного впливу на стан експериментальних тварин, не викликали змін переднього відділу ока й оптичних середовищ. Перші офтальмоскопічні зміни сітківки у вигляді одичних дрібних ділянок малопомітної депігментації відзначалися через 3 тижні після другого введення 5 мкг мелфалану та залишалися незмінними протягом усього терміну спостереження. Через 2 та 3 тижні після третьої ін'єкції відзначали незначне посилення депігментації без збільшення її площі, при подальших оглядах її динаміка була відсутня. У 2-й групі (10 мкг цитостатика) спостережено схожі з 1-ою групою, але більш виражені зміни очного дна, які дещо посилювалися з кожним повторним введенням. Уже після першої ін'єкції 20 мкг цитостатика відзначено перерозподіл пігменту з появою світліших і більших зон депігментації, які посилювалися та збільшувалися за

площею після повторних ІВВ. У 4-й і 5-й групах (30 і 40 мкг мелфалану) після повторних ін'єкцій були виражені зміни сітківки, що проявлялися великими зонами інтенсивної депігментації, які з кожною ін'єкцією збільшувалися за площею до майже повного їх злиття, з інтенсивним зникненням пігменту, зумовлюючи повне знебарвлення сітківки.

У всі терміни спостереження у групах як із меншою, так і з високою концентрацією введеного ІВ мелфалану крововиливи в сітківку та скловидне тіло, розриви й відшарування сітківки відсутні.

Ультраструктурні зміни. У тварин, які отримували повторні ін'єкції 5 мкг мелфалану, ультраструктурні зміни були слабо вираженими, але більш суттєвими, ніж після одноразової ІВ ін'єкції: клітини ПЕС знаходилися в різному стані: частина з них – з елементами деструкції, інші ж мали ознаки внутрішньоклітинних компенсаторно-відновлювальних процесів. Зовнішні сегменти фоторецепторних клітин (ЗСФК) містили зруйновані диски або пошкоджені ділянки: фрагменти зовнішніх шарів (ЗС), розриви плазмолем тощо. Однак інші відділи фоторецепторних клітин (далі – ФК) зберігали свою структуру. Нервові елементи інших відділів сітківки були без змін. Після третьої ін'єкції відзначено різний рівень змін клітин ПЕС: від клітин, що втратили свої типові риси, до більш збережених елементів; заміщення великих ділянок тканини проліферуючими гліальними клітинами (рис. 1). Нервові елементи внутрішніх відділів сітківки загалом збережені, мають лише вогнищеві пошкодження цитоплазматичних структур.

Після дворазового ІВВ 10 мкг (2-га група) мелфалану відзначено збереження архітекtonіки шарів сітківки. У клітинах ПЕС спостерігали різко виражені гідропічні зміни цитоплазми. У відділі зовнішніх сегментів

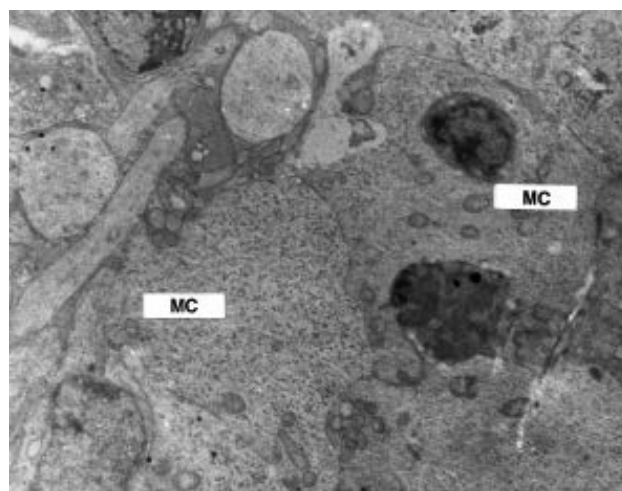


Рис. 1. Ультраструктура сітківки кроля після трьох ІВ ін'єкцій 5 мкг мелфалану (група 1). Електронна мікроскопія X 4 000. Гліоз в шарі ядер фоторецепторних клітин. Умовні позначення: ІВ – інтравітреальні, МС – відростки клітин Мюллера.

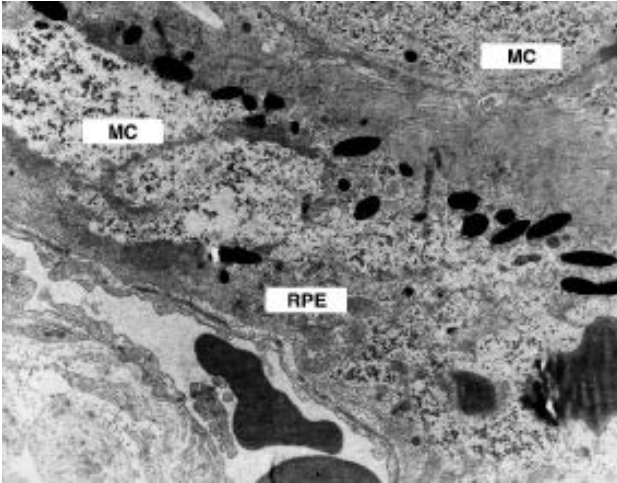


Рис. 2. Ультраструктура сітківки кроля після двох ІВ ін'єкцій 20 мкг мелфалану (група 3). Електронна мікроскопія. X 4000. Деструкція клітин пігментного епітелію сітківки. Умовні позначення: ІВ – інтравітреальні, RPE – пігментний епітелій сітківки, MC – відростки клітин Мюллера.

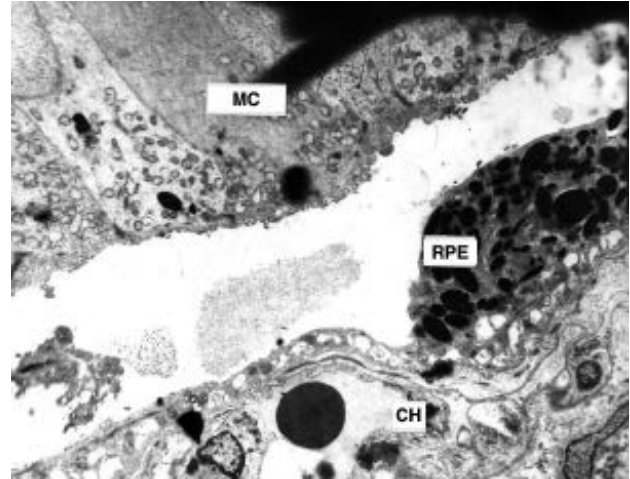


Рис. 3. Ультраструктура сітківки кролика після 2-кратної ІВ ін'єкції 30 мкг мелфалану (4 група). Електронна мікроскопія: X 2500. Деструкція стінки хоріокапілярів, руйнування шару пігментного епітелію, відростки гіпертрофованих гліальних клітин. Умовні позначення: ІВ – інтравітреальні, CH – хоріокапіляри, RPE – пігментний епітелій сітківки, MC – відростки клітин Мюллера.

(ЗС) і внутрішніх сегментів (ВС) ФК – виразний екстрацелюлярний набряк. Ядерну ділянку збережено. В інших шарах сітківки – клітини з різним патологічних змін. Мюллерівські клітини (далі – МЮК) різко гіпертрофовані, подекуди з елементами деструкції. Наявні осередки некрозу нервової тканини. Внутрішні шари сітківки більш збережені. Очевидно, у цей період частина ультраструктур сітківки частково самовідновлювалася.

Після дворазового ІВВ мелфалану в дозі 20 мкг (3-тя група) виявляли хаотично розташовані зруйновані та напівзруйновані структури сітківки. Клітини ПЕС були з різним ступенем деструктивних змін аж до їх розпаду, пігментні гранули розсіяні в масі тканин, виражений гліоз МЮК, при цьому частина гліальних клітин розпадалася. Скрізь зустрічалися некротичні маси й поодинокі макрофаги (рис. 2).

Після повторних ІВВ мелфалану в дозуваннях 30 мкг (4-та група) та 40 мкг (5-та група) відзначені однотипні зміни сітківки: практично повна відсутність шару ПЕС, лише місцями видно уривки та залишки його клітин. Видозмінені пігментні клітини зустрічалися у внутрішніх шарах сітківки. Інші клітинні елементи сітківки також зазнали різних змін чи деструкції. Зовнішній шар і внутрішній шари фоторецепторних клітин відсутні, їх місце розташування заповнене глією. ЗШ ФК сітківки також були пронизані гіпертрофованими відростками клітин глії. Найбільш виражений набряк і деструкція нервових волокон (рис. 3, 4). Гангліозні клітини (ГК) з ознаками дистрофічних змін. У цьому шарі визначався гліоз до внутрішньої прикордонної мембрани сітчастої оболонки. У судинній оболонці спостерігалася майже повна відсутність

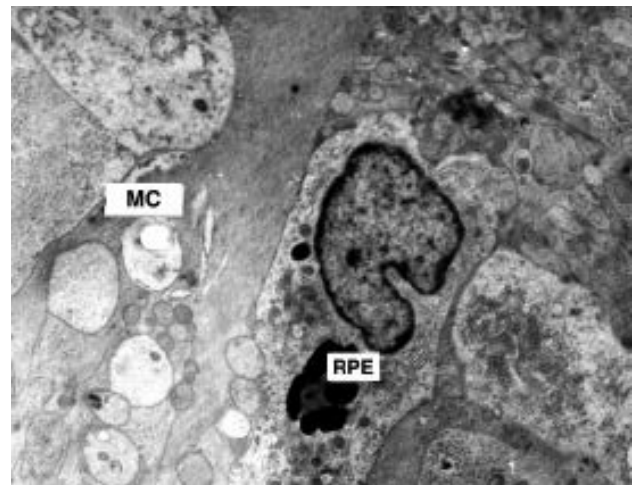


Рис. 4. Ультраструктура сітківки кролика після 2-кратної ІВ ін'єкції 40 мкг мелфалану (5 група). Електронна мікроскопія: X 4000. Деструкція клітин біполярного шару. Гліальні розростання та клітина з пігментними гранулами, яка проникла в цю область. Умовні позначення: ІВ – інтравітреальні, RPE – пігментний епітелій сітківки, MC – відростки клітин Мюллера.

хоріокапілярів (ХК), ендотелій стінки судин хоріоїдеї був з елементами деструкції.

Отже, проведені нами дослідження продемонстрували, що виразності ультраструктурних змін сітківки ока кролика після ІВВ мелфалану залежать і від його дозування, і від кратності ін'єкцій.

Зміни сітківки, виявлені під час ультраструктурного дослідження, корелювали з офтальмоскопічною картиною очного дна.

Обговорення

У клінічній практиці використовують неодноразові введення різних доз мелфалану (від 8 до 50 мкг) з інтервалом від 1 тижня до 1 місяця. При цьому встановлено, що малі дози мелфалану не супроводжуються виразними ускладненнями та структурними змінами ока [7; 10], а дози 50 мкг призводять до грубих і великих атрофічних процесів у сітківці, гіпотонії, атрофії зорового нерва та субатрофії ока [8]. Найчастіше для локальної хіміотерапії використовуються дози 20 і 30 мкг мелфалану [11; 15]. Перші експериментальні дослідження Inomata й Kaneko [9] на кроликах із застосуванням мелфалану в концентрації 5,9 мкг/мл продемонстрували відсутність його токсичності для сітківки. Ueda M. зі співавт. (1995) [18] на основі світлової мікроскопії встановили відсутність зміни ретинальних структур сітківки кролика після одноразової ін'єкції 10 мкг мелфалану, помірні зміни викликала ін'єкція 20 мкг, деградація відзначалася в разі введення 90 мкг. Shimoda та ін. (2008) вивчали токсичний ефект мелфалану на сітківку кроликів при його ІВ перфузії під час вітректомії в концентрації 5, 10 і 20 мкг/мл. При концентрації 5 мкг/мл гістологічна структура сітківки через 28 днів після операції суттєво не змінювалася [17]. Гістологічні зрізи в групі 10 мкг/мл показали некроз внутрішнього ядерного шару та витончення зовнішнього ядерного шару, у групі 20 мкг/мл – утрату зовнішнього ядерного шару та шару фоторецепторів, а також некроз внутрішнього ядерного шару.

Проведені нами раніше [2] дослідження ультраструктурних змін сітківки кролика при одноразовому ІВВ мелфалану в різних концентраціях показали їх залежність від дози препарату, що вводиться. У разі введення 5 мкг зміни були відсутні, у разі введення 10 мкг відзначали деструкцію на окремих ділянках шару ПЕС, шарах і мембранах дисків зовнішнього шару фоторецепторних клітин. При одноразовому введенні 20 мкг шари сітківки були дезорганізовані з порушенням ультраструктури ФК та нейронів сітківки, наявний гліоз МЮК із розпадом внутрішньоклітинних структур або некрозом [2]. У групі, де вводили 30 і 40 мкг, виявлено ушкодження всіх шарів сітківки ХК шару за більш збереженого стану гангліозних клітин, а зруйновані елементи сітківки заміщалися гіпертрофованими відростками МЮК.

Варто зазначити, що експериментальні вивчення впливу різних доз мелфалану при ІВВ на структуру сітківки вкрай обмежено. Bar-Sela S. et al (2018) [14] провели дослідження клінічних і гістологічних (світлова мікроскопія) змін сітківки у 18 кроликів після серії ІВ ін'єкцій мелфалану в різних дозуваннях (5, 15, 30 і 60 мкг) з інтервалом 1 місяць, 2 тижні, 1 тиждень і 3 дні. При одноразовому ІВВ 5 мкг змін сітківки не відзначали, але після повторних уведень морфологічно виявлено незначне витончення внутрішнього та зовнішнього ядерних шарів (до 20%). У разі використання більш високих дозувань навіть при одноразовому ІВВ офтальмоскопувалися склеротичні судини та,

що корелювалося з морфологічними деструктивними змінами у 2 та 3 групах – наявністю склеротичних і дегенеративних структурних змін сітківки, збереженням МЮК із виявленим у них гліального фібрилярного білка, стоншуванням внутрішнього ядерного шару на 21 та 44%, а зовнішнього – на 50 та 64% відповідно. У 4 групі (доза 60 мкг) – відсутність поширеної структурності сітківки, що виявлялося повною дезорганізацією ядерних шарів і вказувало на 100% їх ураження. На нашу думку, така концентрація є вже критичною і небезпечною, тому що в ході попереднього дослідження [2] продемонстровано грубі й виражені атрофічні процеси в сітківці.

Отримані нами дані про залежність стану сітківки від дози мелфалану як при одноразових, так і багаторазових ІВВ після двоетапного експерименту корелюють із даними зарубіжних авторів. Разом із тим наші результати виявилися більш точними й інформативними, оскільки відмінністю дослідження є вивчення сітківки кролика не тільки на гістологічному, а й на ультраструктурному рівнях за допомогою електронної мікроскопії, що дає змогу говорити про більш тонкі зміни в усіх ретинальних шарах залежно від дози та кратності введення мелфалану. Виявлені нами зміни після повторних ІВВ цитостатика з різним інтервалом дають можливість у динаміці спостерігати вплив препарату на сітківку після кількох уведень. Повторні введення 5 мкг були відносно безпечними й мали мінімальну токсичність; 10 мкг викликали зміни в зовнішніх шарах сітківки вогнищами некрозу нервової тканини, але внутрішні шари сітківки залишалися збережені за рахунок часткової їх регенерації: офтальмоскопічно незмінні ділянки сітківки чергувалися з помірної виразності дегенерацією. У разі підвищення дози до 20–30 мкг у результаті токсичного впливу підвищувався рівень виразності та глибина ураження всіх шарів сітківки: розпад і виразний гліоз внутрішньоклітинних структур, наявність некротичних мас та одиничних макрофагів, офтальмоскопічно з кожною повторною ін'єкцією осередковий характер змін заміщався формуванням зливних атрофічних ділянок з інтенсивним зникненням пігменту, призводячи до повного знебарвлення сітківки.

Отже, ми встановили, що основний токсичний вплив при ІВВ мелфалану припадає на сітківку та судинну оболонку, збільшення дози введеного цитостатика посилює виразності й глибину ураження ретинальних шарів. При повторних введеннях доз 5 і 10 мкг зміни сітківки залишалися відносно стабільними, якщо дози збільшували до 20–30 мкг, то відбувалися незворотні деструктивні зміни.

Висновки

1. Експериментально доведено, що повторні інтравітреальні ін'єкції мелфалану в різних дозуваннях не впливали на прозорість оптичних середовищ і структури переднього відділу ока, а також не мали загальної токсичної дії на експериментальних тварин.

2. Клінічні й ультраструктурні зміни сітківки залежали від дози препарату: повторні введення 5 та 10 мкг є відносно безпечними, викликають мінімальні зміни лише в зовнішніх шарах сітківки.

3. Більш високі дози мелфалану (20–30 мкг) варто застосовувати з обережністю, з огляду на токсичні зміни в ретиальному та хоріокапілярному шарах із різним рівнем їх дегенерації, аж до гліозу й некрозу, унаслідок порушення трофіки сітківки та судинної оболонки.

Література

1. **Боброва НФ, Сорочинская ТА.** Комбинированная (интравитреальная и внутривенная) полихимиотерапия в системе органосохранного лечения ретинобластомы. Офтальмол. журн. 2011; 2:38–44
2. **Боброва НФ, Сорочинская ТА, Молчанюк НИ, Братишко АЮ.** Ультраструктурные изменения сетчатки кролика при однократном интравитреальном введении различных доз мелфалана. Офтальмол. журн. 2020;4: 50–55.
3. **Боброва НФ, Сорочинская ТА.** Интравитреальная химиотерапия ретинобластомы (пятилетний опыт). Офтальмол. журн. 2015; 3: 59–68.
4. Ретинобластома: моногр. / Под ред. Н.Ф. Бобровой. Одесса: Издательский центр, 2020: 324 с.
5. **Bobrova NF, Sorochinskaya TA.** Local retinoblastoma chemotherapy by intravitreal melphalan injections (the preliminary report). South-East European Journal of Ophthalmology. 2009; 2(3–4):28–34
6. **Francis JH, Brodie SE, Marr B, Zabor EC, Monde-sire Crump I, Abramson DH.** Efficacy and Toxicity of Intravitreal Chemotherapy for Retinoblastoma: Four-Year Experience. Ophthalmology. 2017; Apr; 124(4):488–495.
7. **Ghassemi F, Fahimeh Asadi Amoli F.** Pathological findings in enucleated eyes after intravitreal melphalan injection. Int Ophthalmol. 2014 Jun;34(3):533–40.
8. **Ghassemi F, Shields CL.** Intravitreal melphalan for refractory or recurrent vitreous seeding from retinoblastoma. Arch Ophthalmol. 2012; 130: 1268–1271.
9. **Inomata M, Kaneko A.** Chemosensitivity profiles of primary and cultured retinoblastoma cells in a human tumor clonogenic assay. Jpn J Cancer Res 1987; 78 (8): 858–868.
10. **Kaneko A, Suzuki S.** Eye-Preservation Treatment of Retinoblastoma with Vitreous Seeding. Jap. J.Clin.Oncol. 2003; 33: 601–607.
11. **Munier FL, Gaillard MC, Soliman S. et al.** Intravitreal chemotherapy for vitreous disease in retinoblastoma revisited: from prohibition to conditional indications. BrJ Ophthalmol. 2012; 96(8): 1078–1083.
12. **Reynoldes ES.** The use of lead citrate at high pH an electron opaque stain in electron microscopy. I. of Cell Biol. 1963; 17: 208–212.
13. **Shah N, Pham D, Murray T. et al.** Intravitreal and Subconjunctival Melphalan for Retinoblastoma in Transgenic Mice. Journal of Ophthalmology. Volume 2014, Article ID 829879.
14. **Shai M Bar-Sela, Shiri Zayit-Soudry, Amir Massarweh et al.** Retinal Toxicity of Intravitreal Melphalan in Albino Rabbit Investigative Ophthalmology & Visual Science June 2018; 56: 75.
15. **Shields CL, Douglass AM, Beggache M, Say EA, Shields JA.** Intravitreal chemotherapy for active vitreous seeding from retinoblastoma: Outcomes After 192 Consecutive Injections. The 2015 Howard Naquin Lecture. Retina. 2016; Jun; 36(6): 1184–90.
16. **Shields CL, Lally SE, Leahey AM, Jabbour PM, Caywood EH, Schwendeman R, et al.** Targeted retinoblastoma management: When to use intravenous, intra-arterial, periocular, and intravitreal chemotherapy. Curr Opin Ophthalmol. 2014;25:374–85.
17. **Shimoda Y, Hamano R, Ishihara K. et al.** Effects of intraocular irrigation with melphalan on rabbit retinas during vitrectomy. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2008; 246(4): 501–508.
18. **Ueda M, Tanabe J, Inomata M. et al.** Study on conservative treatment of retinoblastoma - effect of intravitreal injection of melphalan on the rabbit retina. Nihon Ganka Gakkai Zasshi. 1995; 99(11): 1230–1235.

Відомості про авторів та розкриття інформації

Внесок авторів. Всі автори приймали участь в розробці концепції статті та в написанні рукопису. Остаточна версія рукопису була ухвалена всіма авторами, які в свою чергу несуть повну відповідальність за надання її остаточної версії до друку.

Декларація про конфлікт інтересів. Всі автори не мають жодного реального чи потенційного конфлікту інтересів (фінансові, персональні, професійні та інші інтереси), які б могли вплинути на предмет чи матеріал, описаний та обговорений в даному рукописі.

Джерела підтримки. Зовнішні джерела фінансування відсутні.

Надійшла 19.10.2022