

УДК 617.7-085.277.3-091-092.9

Клінічні та патоморфологічні зміни очей кроликів після одноразового внутрішньокамерного введення різних доз цитостатика мелфалану

Н. Ф. Боброва, д-р мед. наук, професор; Т. А. Сорочинська, канд. мед. наук;
С. А. Троніна, канд. мед. наук; Т. В. Романова, канд. мед. наук; Н. І. Молчанюк, канд. біол. наук;
О. Ю. Братішко, м.н.с.; А. В. Шилик, м. н. с.

ДУ «Інститут очних хвороб та тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України»

Одеса (Україна)

Ключові слова:

внутрішньокамерна хіміотерапія, патоморфологічні зміни, мелфалан, ретинобластома, сітківка, цитостатики, ретинобластома, сітківка, хіміотерапія, внутрішньоочна пухлина

Вступ. Ретинобластоми з відсівами пухлини в камерну вологу асоціюються не тільки з поганим прогнозом щодо збереження ока як органу, але, також, вважаються фактором високого ризику метастазування, й тому мають абсолютне показання для проведення енуклеації та наступного лікування [1-4, 5].

Останнім часом з'явилися поодинокі дослідження спроб лікування таких ретинобластом шляхом внутрішньокамерної хіміотерапії (ВКХ). Перші позитивні результати внутрішньокамерного введення цитостатика мелфалану були опубліковані Munier F. L. у 2015-2018 рр. [4, 6].

Однак, вплив цитостатика мелфалану на структури переднього сегмента ока (рогівку, райдужку, передню капсулу кришталика) досі невідомі, оскільки експериментальні дослідження не проводились.

Мета – вивчити в експерименті зміни структур переднього сегмента ока кроликів після введення в

Вступ. Останнім часом з'явилися поодинокі дослідження спроб лікування ретинобластом з відсівами пухлини в камерну вологу шляхом внутрішньокамерної хіміотерапії (ВКХ). Однак, вплив цитостатика мелфалану на структури переднього сегмента ока (рогівку, райдужку, передню капсулу кришталика) досі невідомі, оскільки експериментальні дослідження не проводились.

Мета роботи. Вивчення в експерименті зміни структур переднього сегмента ока кроликів після введення в передню камеру різних концентрацій алкілувального цитостатика мелфалану.

Матеріал та методи. Експериментальні дослідження проводилися на базі віварію ДУ «Інститут очних хвороб та тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України» на 22 очах 12 статевозрілих кроликів породи шиншила одного віку (від 5 місяців до 6 місяців) та ваги – від 2,5 кг до 3 кг, які утримувалися в окремих клітках в стандартних умовах.

Результати. Після ін'єкції мелфалану у дозі 5 мкг зміни в рогівці та райдужці були зворотними, а кришталик залишався прозорим. Зі збільшенням дози (10, 15, 20 мкг) та строків (до 1 місяця і 3 тижнів) дегенеративні зміни в частині клітин райдужки були незворотними; також формувалась передньокапсулярна катаракта; рогівка та волога передньої камери залишались інтактними. Збільшення дози до 20 мкг навіть при однократній внутрішньокамерній ін'єкції призводило до розвитку задніх синехій з депігментацією райдужки та передньокапсулярної катаракти.

Висновки. Клінічна та ультраструктурна реакції тканин переднього сегмента ока при внутрішньокамерному введенні цитостатика мелфалану залежала від величини введеної дози та строків спостереження. Після припинення токсичної дії препарату ультраструктура більшості клітин досліджуваних тканин зберігала здатність до відновлення.

передню камеру різних концентрацій алкілувального цитостатика мелфалану.

Матеріал та методи дослідження

Експериментальні дослідження проводилися на базі віварію ДУ «Інститут очних хвороб та тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України» на 22 очах 12 статевозрілих кроликів породи шиншила одного віку (від 5 місяців до 6 місяців) та ваги – від 2,5 кг до 3 кг, які утримувалися в окремих клітках в стандартних умовах.

Дослідження проводили з дотриманням нормативів, схвалених Законом України від 15.12.2009 р. №1759-VI «Про захист тварин від жорстокого поводження». Протокол з біоетики №1 від 26.03.2019 р.

Дизайн дослідження не передбачав статистичної обробки отриманих даних.

Відповідно до поставленого завдання, всім кроликам в передню камеру ока вводили цитостатик мелфалан у різних концентраціях. Залежно від дози введеного цитостатика експериментальні тварини були розподілені на 5 груп: 1 група – 5 мкг/0,1мл (3 кролика); 2 група – 10 мкг/0,1мл (2 кролика); 3 група – 15 мкг/0,1мл (3 кролика); 4 група – 20 мкг/0,1мл (2 кролика), 5 група – контрольна (інтактні тварини) – 2 кролика, яким в передню камеру вводили фізіологічний розчин.

Інтракамеральна хіміотерапія в експерименті проводилась за наступною методикою: ін'єкція виконувалась в умовах загальної анестезії, під операційним мікроскопом; інстиляція в кон'юнктивальну порожнину анестетика, обробка операційного поля 0,5% спиртовим розчином хлоргексидину, установка блефаростату; на 1 год голкою 32G формувалась довгий рогівковий тунель через лімб, проводилась аспірація вологи передньої камери в максимальній кількості (0,25-0,3 мл); залишаючи голку в рогівковому каналі, проводили заміну шприца на наступний з розчином мелфалану в різних дозуваннях (5 мкг/0,1мл, 10 мкг/0,1мл, 15 мкг/мл, 20 мкг/0,1мл), який вводили одноразово в передню камеру в кількості 0,1 мл; наприкінці процедури – інстиляція в кон'юнктивальну порожнину розчину антибіотика.

Всі тварини після кожного введення отримували місцеву терапію антисептичними та антибактеріальними краплями. Огляд за допомогою біомікроскопії з використанням щільної лампи здійснювався наступного дня та на 3-14 добу після операції з оцінкою стану переднього відділу ока (наявність запальних реакцій, прозорість оптичних середовищ). Забір матеріалу для патгістологічного дослідження та електронної мікроскопії проводився через 14 діб, 1 місяць та 1 місяць і 3 тижні після виведення кроликів з експерименту шляхом емболії та енуклеації ока. Рогівка, райдужка, цилиарне тіло, трабекулярна тканина та передня капсула кришталика забирались через 14 діб (5, 10, 15, 20 мкг/0,1мл), 1 місяць (5, 10, 15, 20 мкг/0,1мл) та 1 місяць і 3 тижні (5, 15 мкг/0,1мл) після однократних ін'єкцій вищевказаних доз. У контрольній групі в передню камеру вводився фізіологічний розчин у кількості 0,1 мл.

У 1 групі – 5 мкг/0,1мл (3 кролика) строки спостереження становили: 14 діб (1 кролик, 2 ока), 1 місяць (1 кролик, 2 ока), 1 місяць 3 тижні (1 кролик, 2 ока). У 2 групі – 10 мкг/0,1мл (2 кролики) забір матеріалу проводився через 14 діб (1 кролик, 2 ока), 1 місяць (1 кролик, 2 ока). У 3 групі – 15 мкг/0,1мл (3 кролики) строки спостереження були наступними: 14 діб (1 кролик, 1 око), 1 місяць (1 кролик, 2 ока), 1 місяць 3 тижні (1 кролик, 2 ока). 4 група – 20 мкг/0,1мл (2 кролики), строки спостереження: 14 діб (1 кролик, 1 око), 1 місяць (1 кролик, 2 ока). 5 група – контрольні (інтактні тварини) – 2 кролики, строки спостереження: 14 діб (1 кролик, 2 ока), 1 місяць 3 тижні (1 кролик, 2 ока).

Для електронно-мікроскопічного дослідження тканини ока фіксувались у 2,5 % розчині глутаральдегіду на фосфатному буфері при значенні рН – 7,4 з додатковою дофіксацією 1% розчином осмієвої кислоти при тому ж рН буферного розчину. Потім зразки тканини зневоднювали в спиртах висхідної концентрації. Просочення та їх полімеризація проводились в суміші епоксидних смол епон-аралдит. Контрастування ультратонких зрізів відбувалось за методикою Reynolds [7]. Фотографії зразків ока та їх вивчення проводились на електронному мікроскопі ПЕМ-100-01.

Результати

Загальносоматичний стан тварин в усіх групах, не залежно від введеної дози препарату, зберігався задовільним, загальнотоксичної дії внутрішньокамерно введеного цитостатика на стан тварин не спостерігалось.

При огляді очей кролика на наступний день після операції у всіх випадках була незначна кон'юнктивальна ін'єкція, яка поступово зменшувалась, і на 5-7 день була взагалі відсутня. У всіх тварин передня камера відновила до середньої глибини, внутрішньоочний тиск (пальпаторно) зберігався в межах норми, рефлекс з очного дна був рожевий.

В 1 та 2 групах очей, що отримали ВК ін'єкцію 5 мкг та 10 мкг у при біомікроскопії змін в структурах переднього відділу ока та ексудативної запальної реакції не відмічалось; протягом всього періоду спостереження, рогівка та волога передньої камери залишались прозорими, колір та малюнок райдужки не змінились, кришталик залишався прозорим. У 3 групі (15 мкг мелфалану) відмічалась незначна депігментація райдужки в ділянці введення цитостатика, рогівка та кришталик залишались прозорими. У 4 групі (20 мкг мелфалану) 3 очей рогівка та волога в передній камері залишались прозорими, у ділянці введення цитостатика відмічалась локальна атрофія райдужки з її депігментацією, формування задньої синехії та локальне інтенсивно біле помутніння передньої капсули кришталика. Протягом 2-х тижнів райдужка частково відновила свій колір, синехія майже розсмокталась, сформована передньокапсулярна катаракта залишилась непрогресивною. У всі терміни спостереження як у групах із нижчою, так і з високою концентрацією введеного ВК цитостатика, крововиливів в передню камеру та ексудативних реакцій ультраструктур не спостерігалось.

При гістоморфологічному дослідженні в ендотеліальних клітинах (ЕК) рогівки після ін'єкції різних доз мелфалану ознаки процесу піноцитозу були практично відсутніми. Зі збільшенням дози мелфалану та строків спостереження частота ЕК з ознаками деструктивних змін та появою окремих клітин з ознаками некрозу зростали. Водночас спостерігалась незначна кількість ЕК з ультраструктурою близькою до норми (рис. 1 а, б).

Через 14 діб після ін'єкції мелфалану у дозі 5 мкг в передню камеру ока кроликів в клітинах пігментного

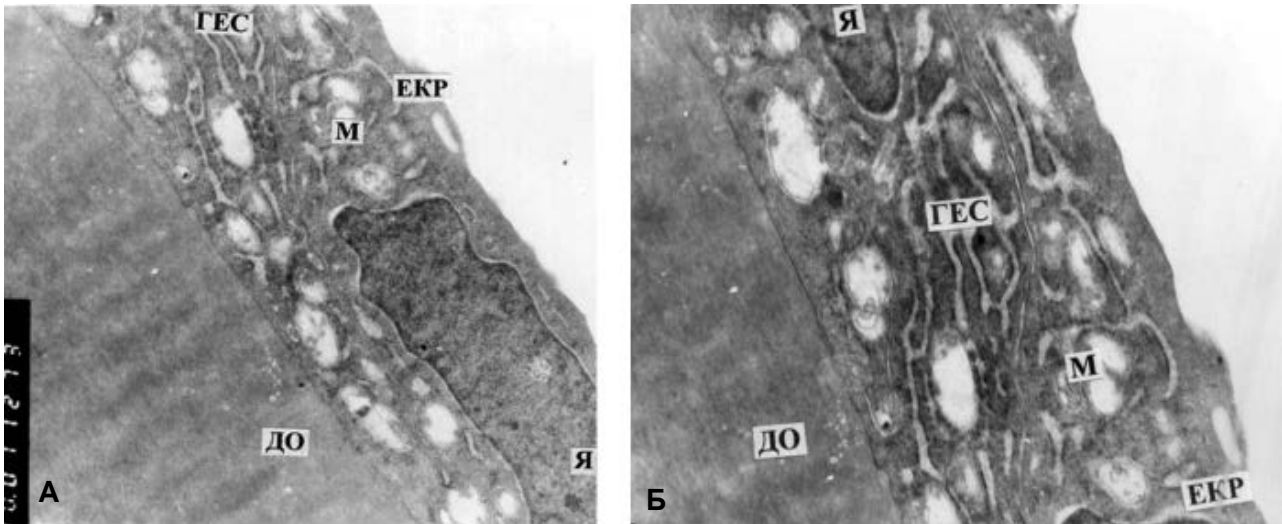


Рис. 1. Ультраструктура рогівки через 1 місяць після ін'єкції мелфалану в передню камеру ока кролика, доза 10 мкг. А – вакуолізація мітохондрій та атрофія гранулярної ендоплазматичної сітки в ендотеліальній клітині. X 10 000; Б – вакуолізація мітохондрій та атрофія гранулярної ендоплазматичної сітки в ендотеліальній клітині. X 6 000. Умовні позначення: ЕКР – ендотеліальна клітина рогівки, ДО – десцеметова оболонка, М – мітохондрії, Я – ядро, ГЕС – гранулярна ендоплазматична сітка.

епітелію райдужки, переважно заднього шару, розвивались дистрофічні зміни (зерниста та легка гідропічна дистрофія). Через 14 діб після ін'єкції мелфалану у дозах 10 мкг, 15 мкг та 20 мкг гідропічна дистрофія в клітинах пігментного епітелію проявлялась в більшій кількості клітин та, зі збільшенням дози препарату, набряк наростав як у клітинах пігментного епітелію, так і в структурах строми (рис. 2).

Таким чином, після ін'єкції мелфалану у дозі 5 мкг, незалежно від строку забору (від 14 діб до 1 місяця та

3 тижнів), в клітинах пігментного епітелію райдужки відбуваються незначні однотипні зміни, які проявляються, в основному, явищами зернистої та легкої гідропічної дистрофії, які носять зворотний характер.

Зі збільшенням дози (10, 15 і 20 мкг) та строків (до 1 місяця 3 тижнів) після ін'єкції мелфалану, дегенеративні зміни в частині епітеліальних клітин райдужки були незворотними та призводили до деструкції органел, гелізації гіалоплазми, розширення міжклітинних контактів та порушення архітекtonіки епітеліального

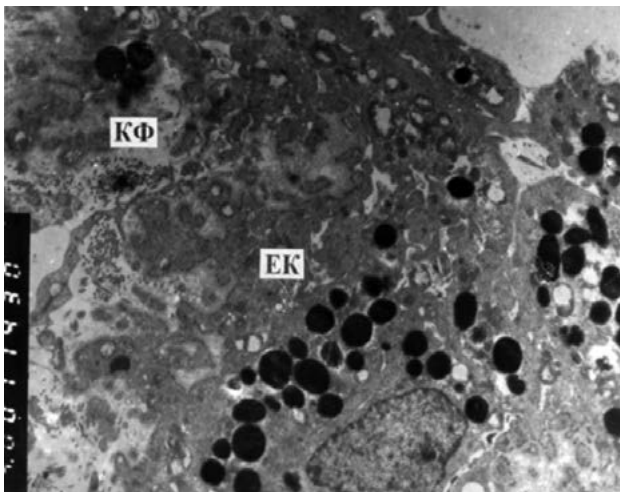


Рис. 2. Ультраструктура райдужки через 1 місяць та 3 тижні після ін'єкції мелфалану в передню камеру ока кроликів, доза 15 мкг. Гідропічна дистрофія клітин пігментного епітелію двох шарів. Розширення міжклітинних контактів. X 4 000.

Умовні позначення: Райд – райдужка, КФ – колагенові фібрили, ЕК – епітеліальна клітина.

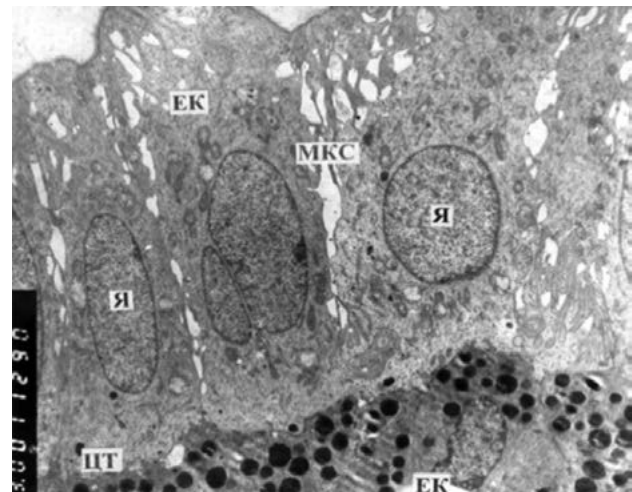


Рис. 3 Ультраструктура циліарного тіла кролика через 1 місяць після ін'єкції мелфалану в передню камеру ока, доза 10 мкг. Розширення міжклітинних контактів між епітеліальними клітинами безпігментного шару цистерн гранулярної ендоплазматичної сітки у його відростках. X 3 000. Умовні позначення: ЦТ – циліарне тіло, ЕК – епітеліальна клітина, Я – ядро, МКС – міжклітинне сполучення.

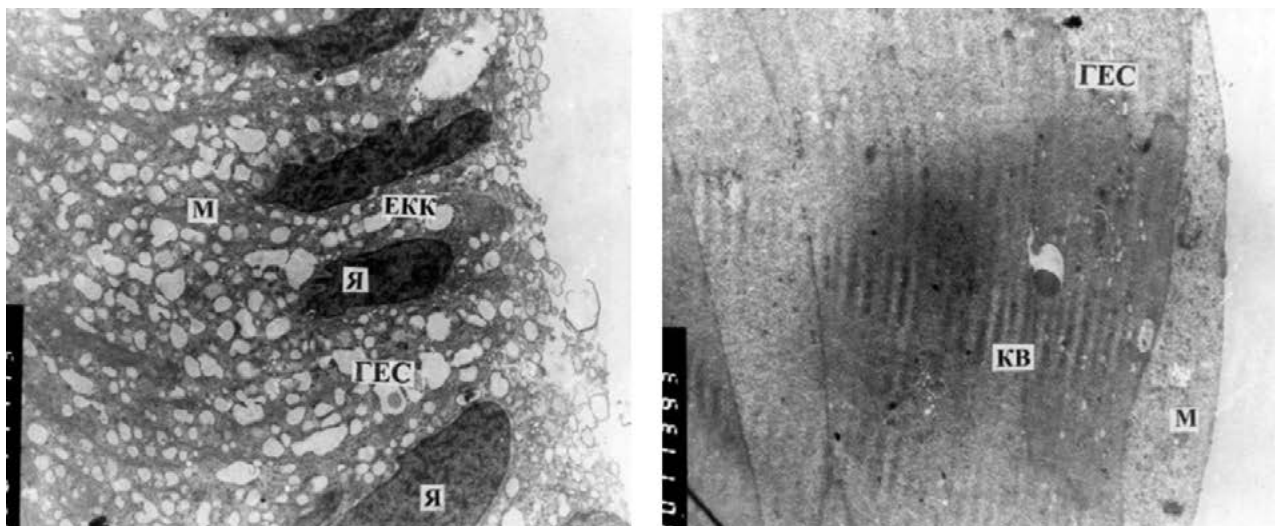


Рис. 4. Ультраструктура кристаліка кролика через 1 місяць та 3 тижні після ін'єкції мелфалану в передню камеру ока, доза 15 мкг. а – піниста цитоплазма епітеліальних клітин з руйнуванням плазмолеми. Х 4 000; б – зерниста дистрофія кристалікових волокон. Х 3 000.

Умовні позначення: ЕКК – епітеліальні клітини кристаліка, Я – ядро, М – мітохондрії, ГЕС – гранулярна ендоплазматична сітка, КВ – кристалікові волокна, ГЕС – гранулярна ендоплазматична сітка.

пласта, що, своєю чергою, призводило до зниження метаболічних процесів та погіршення функціональної активності райдужки.

Після ін'єкції мелфалану в епітеліальних клітинах безпигментного шару циліарного тіла розвивались дистрофічні процеси, а глибина їх проявів була прямопропорційною до збільшення застосованої дози. Першочергово (для дози 5 мкг) вони проявляються в епітеліальних клітинах безпигментного шару та, переважно, у його відростках, легкими гідропічними змінами, які мали зворотний характер після введення токсичної речовини. Зі збільшенням строків спостереження та доз мелфалану, деструктивні процеси в клітинах цього шару прогресували, руйнувались міжклітинні контакти та розповсюджувались на клітини пигментного шару. Також збільшувався набряк в стромі, колагенові волокна ставали рихлими, розташованими розріджено, клітини сполучної тканини мали ознаки гідропічних змін. Однак, слід зазначити, що ультраструктура епітеліальних клітин циліарного тіла була пошкоджена меншою мірою, порівняно з райдужкою.

Реакція трабекулярної тканини, як і інших тканин кута передньої камери, на ін'єкції мелфалану була однотиповою. Однак, в області цієї тканини значною мірою проявлявся набряк основної речовини сполучної тканини, трабекули були розташовані розріджено, а структура ендотеліальних клітин патологічно змінювалась. З підвищенням введеної дози мелфалану в передню камеру трабекули розпадались, ендотеліальна стінка Шлемового каналу руйнувалась.

Епітеліальні клітини передньої капсули кристаліка реагували проявами зернистої дистрофії (для дози 5 мкг); зі збільшенням дози токсичної речовини в клі-

тинах розвивалась різної глибини проявів гідропічна дистрофія. Залежно від збільшення строків спостереження та доз мелфалану, інтенсивність набрякових змін у клітинах посилювалась та супроводжувалась руйнуванням їх плазмолеми. Слід зазначити, що кристалікові волокна також мали дистрофічні зміни (рис. 4 а, б).

Слід зазначити, що ендотелій рогівки, епітелій кристаліка та трабекулярна тканина виявили більшу чутливість до токсичної дії мелфалану в експерименті при введенні його в передню камеру. Після припинення токсичної дії препарату ультраструктура більшості клітин досліджуваних тканин зберігала здатність до відновлення.

Обговорення

Досвід застосування внутрішньокамерної хіміотерапії (ВКХ) різко обмежений. Munier зі співавт. повідомляє про успішне лікування за допомогою ВКХ первинної та вторинної інвазії РБ у камерну вологу [4, 6]. У найбільшій описаній натеper серії (11 очей) по лікуванню вторинної інвазії камерної вологи шляхом внутрішньокамерного введення мелфалану, повідомлялося про початкову повну регресію РБ в камерній волозі, підтверджену у всіх випадках цитопатологічним дослідженням, проведеним не менш ніж через місяць після середньої кількості ін'єкцій 4,3 (діапазон 2–7), середня доза становила 6,3 мкг (діапазон 2,9–15 мкг) на ін'єкцію. Більш ніж половина пролікованих очей були збережені. Автори також зазначали, що ятрогенне порушення переднього гіалоїду має негативний вплив на прогноз збереження ока через недостатню дозу цитостатика для впливу на пухлинний процес у передньому сегменті ока [6]. Серед ускладнень Moll, Munier зі спі-

вавт. [8, 6] відзначили розвиток токсичної катаракти та гіпохромної гетерохромії райдужної оболонки. Автори повідомили про енуклеацію 5 очей, що проводилась, в середньому, через 8,8 місяця (діапазон 1,0–20,7 місяця) після першого внутрішньокамерного введення цитостатика з приводу прогресивного захворювання. Pavlidou E. зі співавт. [9] вважають, що поряд з лікарською стійкістю пухлини до дії цитостатика, у випадках вторинної енуклеації очей з пухлинним ростом в передній камері, відбувався частковий некроз пухлини та вивільнення її клонів, які струмом внутрішньоочної рідини переміщуються в передній сегмент ока.

Висновок

Вивчення клінічної та ультраструктурної реакції тканин переднього відрізка ока при внутрішньокамерному введенні цитостатика мелфалану в експерименті на кроликах показало, що після ін'єкції мелфалану у дозі 5 мкг зміни в рогівці, райдужці були зворотними, а кришталик залишався прозорим. Зі збільшенням дози (10, 15, 20 мкг) та строків (до 1 місяця і 3 тижнів) дегенеративні зміни в частині клітин райдужки були незворотними, також формувалась передньокапсулярна катаракта, рогівка та волога передньої камери залишались інтактними. Збільшення дози до 20 мкг навіть при однократній внутрішньокамерній ін'єкції призводило до розвитку задніх синехій з депігментацією райдужки та передньокапсулярної катаракти, а ультраструктурні дослідження виявили дистрофічні зміни в епітелії кришталика, райдужці та трабекулярній тканині, які наростали зі строком спостереження та мали незворотний характер.

Література

1. **Боброва НФ, Віт ВВ, Сорочинська ТА, Смаглій ДВ.** Клініко-гістологічні паралелі при ретинобластомах високого ризику дисемінації пухлинного процесу. Матеріали XIV з'їзду офтальмологів України, м. Одеса 23-25 трав. 2018 р., Одеса, 2018. С. 207-208.
2. **Боброва НФ.** Ретинобластома: монографія. Одеса: Видавничий центр, 2020. -324 с.

3. **Linn Murphree A.** Intraocular Retinoblastoma: the Case for a New Group Classification. *Ophthalmology Clinics of North America.* 2005 Mar; 18(1):41–53.
4. **Munier FL, Gaillard M-C, Decembrini S.** Aqueous seeding: fall of the ultimate intraocular retinoblastoma sanctuary by a new in situ chemotherapy technique. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2015; 56:1663–63.
5. **Shields CL, Ramasubramanian A, Thangappan A, et al.** Chemoreduction for group E retinoblastoma: comparison of chemoreduction alone versus chemoreduction plus low-dose external radiotherapy in 76 eyes. *Ophthalmology* 2009; 116:544–51
6. **Munier FL, Moulin A, Gaillard MC, Bongiovanni M, Decembrini S, Houghton S, Beck-Popovic M, Stathopoulos C.** Intracameral Chemotherapy for Globe Salvage in Retinoblastoma with Secondary Anterior Chamber Invasion. *Ophthalmology.* 2018 Apr;125(4):615-617.
7. **Reynoldes E. S.** The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* 1963 Apr; 17(1):208-12.
8. **Moll AC, Imhof SM, Schouten-van Meeteren AYN, Boers M, van Leeuwen F, Hofman P.** Chemoreduction for retinoblastoma. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill: 1960)* 2003 Oct 1; 121(10):1513.
9. **Pavlidou E, Burris C, Thaug C, et al.** Anterior segment seeding in eyes with retinoblastoma failing to respond to intraophthalmic artery chemotherapy. *JAMA Ophthalmol* 2015; 133:1455

Відомості про авторів та розкриття інформації

Внесок авторів. Усі автори брали участь у зборі даних, аналізі результатів, написанні рукопису та погодили кінцевий варіант рукопису.

Конфлікт інтересів. Автори засвідчують про відсутність конфлікту інтересів, який б міг вплинути на їх думку стосовно предмету чи матеріалів, описаних та обговорених в даному рукопису.

Відмова від відповідальності. Автори заявляють, що висловлені у поданій статті думки є їх власними, а не офіційними позиціями установи.

Надійшла 22.09.2023