

РОЛЬ СТЕКЛОВИДНОГО ТЕЛА И СУБРЕТИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ В ПРОЦЕССАХ ПРОЛИФЕРАЦИИ ПРИ ОТСЛОЙКЕ СЕТЧАТКИ

А. Н. Сергиенко, д-р мед. наук, **Г. И. Лавринчук**, д-р биол. наук,

Е. В. Власко, врач, **Л. М. Литвинчук**, врач

Киевская городская клиническая офтальмологическая больница «Центр микрохирургии глаза», г. Киев
Государственное учреждение «Научный центр радиационной медицины АМН Украины», г. Киев

В дослідження були включені 10 аспіратів скловидного тіла та 9 зразків субретинальної рідини. Всі зразки отримувалися під час виконання задньої закритої вітректомії у 12 пацієнтів з регматогенним відшаруванням сітківки. Досліджувані зразки культивувалися разом з культурою первинних клітин L₉₂₉ по стандартному протоколу. Досліджували кінетику показників життєздатності клітин — виживання, мітотичний індекс та індекс полікаріоцитів.

Інкубація клітинних культур із скловидним тілом призводила до зниження адгезивних якостей клітин. Виживання клітин склало 75 % в порівнянні з контрольною групою.

Інкубація клітинних культур із субретинальною рідиною призводила до деградації моношару клітин внаслідок їх репродуктивної загибелі. Виживання клітин склало 28 % від контрольної групи.

Отримані дані дозволяють трактувати неповну регенерацію фоторецепторів під час відшарування сітківки наслідком шкідливого впливу компонентів субретинальної рідини.

Ключевые слова: отслойка сетчатки, стекловидное тело, субретинальная жидкость, пролиферация

Ключові слова: відшарування сітківки, скловидне тіло, субретинальна рідина, проліферація

ВВЕДЕНИЕ. Отслойка сетчатой оболочки приводит к быстрому и прогрессирующему изменению в тканях сетчатки и стекловидном теле. Даже после успешных операций ультраструктурные изменения и метаболизм сетчатки не восстанавливаются полностью. Причины нарушений кроются в компенсаторных механизмах клеточной миграции, пролиферации и абсорбции жидкости для восстановления целостности гемато-ретиальных барьеров. Следствием запуска этих клеточных механизмов является частичная дедифференциация клеток пигментного эпителия сетчатки (ПЭС) [6], пролиферация и миграция клеток ПЭС в субретинальном пространстве [6, 7, 10], гибель части популяции фоторецепторов и дегенерация наружных сегментов фоторецепторов в выживших клетках [5, 10], глиальная реконструкция нейроэпителия с гипертрофией Мюллеровских клеток [3, 8], инфильтрация стекловидного тела воспалительными и глиальными клетками с формированием пролиферативных мембран [1, 2].

По обе стороны от отслоенного нейроэпителия миграционные и пролиферативные процессы протекают различно. Одним из отличий является сдерживание формирования мембран в субретинальной полости при острой и подострой отслойках сетчатки. Причина различия в реактивности тканей может заключаться в составе и свойствах жидкостей, которые ее омывают.

Цель настоящего исследования — раскрыть механизмы влияния стекловидного тела и субретинальной жидкости на клеточные культуры *in vitro* при отслойке сетчатки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

В исследование были включены 10 аспиратов стекловидного тела и 9 образцов субретинальной жидкости. Все образцы получались во время выполнения задней закрытой витректоми у 12 пациентов с регматогенной отслойкой сетчатки. Все пациенты имели изменения в стекловидном теле, характерные для ПВР начальной и умеренной степеней. Образцы стекловидного тела в объеме 0,5 мл набирались через стандартный порт в плоской части цилиарного тела до открытия ирригационного рукава. Субретинальная жидкость в объеме 0,3–0,5 мл набиралась экструзионной канюлей через ретиальный разрыв. Образцы жидкостей наносились на асинхронную культуру перевивных клеток (линия L₉₂₉). Клетки L₉₂₉ избраны для моделирования пролиферативного процесса *in vitro*, поскольку морфологически обладают свойствами фибробластоподобных клеток. Культивирование клеток проводили по общепринятому протоколу работы с культуральными штаммами на питательной среде (состав: RPMI-1640 (90 %)), эмбриональная телячья сыворотка (10 %) и гентамицин из расчёта 10 мкг/мл). Клеточные эффекты оценивали в сроки от 1 до 5 суток по показателям жизнеспособности клеток: пролиферативная активность — выживание, митотическая активность — митотический индекс, и гетерогенность популяции клеток — индекс поликаріоцитів. Кинетику показателей жизнеспособности в интактных и исследуемых клетках определяли одновременно в проточном цитофлуориметре FACStarPlus фирмы «Becton Dickinson» (США). Статистическая обработка результатов проводилась с помощью t-критерия Стьюдента и пакетов программ Microsoft Excel и Biostat.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Интактные клетки линии L₉₂₉ образовывали плотный

монослой с типичными фибробластоподобными клетками, с характерными для них светлыми вакуолями и маленькими гранулами. В поле зрения встречались 2–5 клеток на разных стадиях деления (рис. 1). Максимум митотической активности был отмечен на третьи сутки культивирования. Индекс гигантских поликариоцитов составлял 8–17 %.

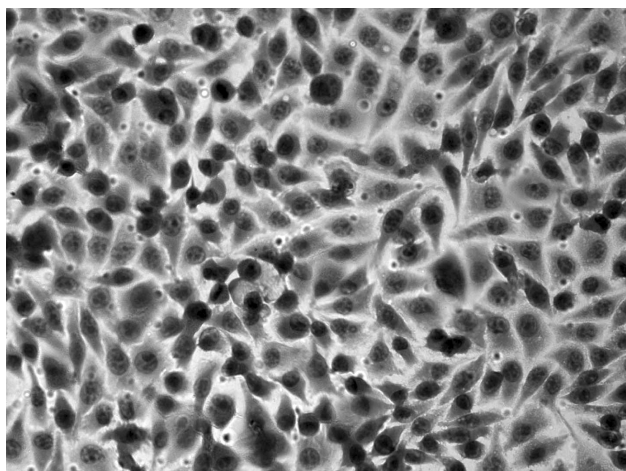


Рис. 1. Культура трансформированных фибробластов линии L₉₂₉ на пятые сутки культивирования в интактном контроле. Клетки полигональной формы образуют плотный монослой. В поле зрения значительное количество клеток в разных фазах митоза. Ядра клеток в большинстве округлой формы, четко выделяются 2–4 ядрышка. Окрашивание гематоксилин-эозином, увеличение x 1000.

Исследование влияния стекловидного тела у пациентов с отслойкой сетчатки на пролиферацию и митотическую активность в тест-системе культуры клеток линии L₉₂₉ условиях объединенного культивирования выявило как ингибирующее, так и стимулирующее действие его составляющих. Пример такого воздействия на пробах стекловидного тела № 1–4 показан на рис. 2.

Ингибирующее влияние стекловидного тела проявлялось в уменьшении плотности клеточной популяции на фоне относительно высокой митотической активности. Стимулирующий эффект стекловидного тела проявлялся в увеличении количества клеток на единицу монослоя, что приводило к контактному ингибированию митотической активности и уменьшению митотического индекса. На участках клеточных культур появлялись участки многослойных образований в виде пятен или линий (рис. 3). Обращает внимание невысокий индекс поликариоцитов при этих условиях.

Наличие островков групп клеток над плотным монослоем может свидетельствовать о нарушении адгезии клеток. Основная масса клеток полигональной формы, редко — веретенообразной. Цитоплазма — диффузная, ядра клеток овальной формы с несколькими четко выраженными ядрышками.

В поле зрения значительное количество клеток в разных фазах митоза.

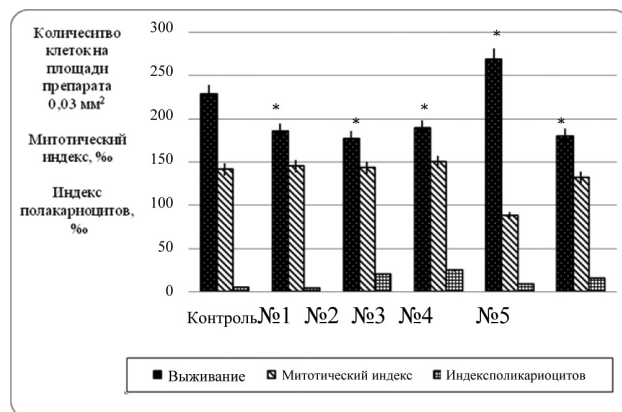


Рис. 2. Показатели жизнедеятельности (пролиферативная активность, митотическая активность и индекс поликариоцитов) клеток линии L₉₂₉ в условиях совместного культивирования со стекловидным телом у пациентов с отслойкой сетчатки.

Примечание: * — достоверность отличий в сравнении с контролем p < 0,05.

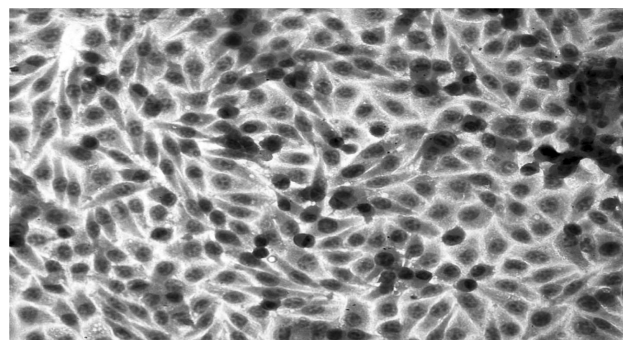


Рис. 3. Структура культуры клеток линии L₉₂₉ при добавлении в питательную среду стекловидного тела.

Результирующая диаграмма выживания клеток линии L₉₂₉ представлена на рис. 4.

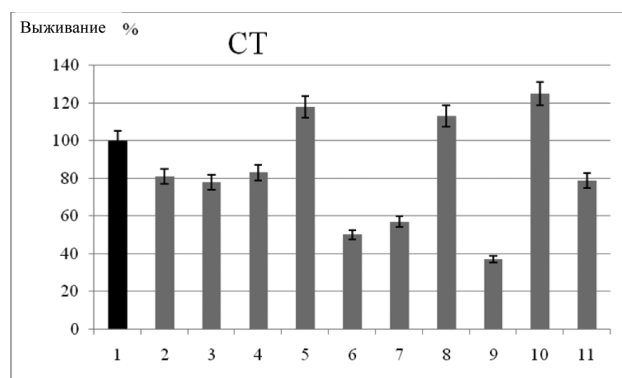


Рис. 4. Выживание клеток линии L₉₂₉ в монослойной культуре в условиях совместного культивирования со стекловидным телом (СТ) у пациентов с отслойкой сетчатки (по всем препаратам).

Инкубация клеток с субретинальной жидкостью у пациентов с отслойкой сетчатки статистически достоверно приводит к угнетению выживания и пролиферации в культуре клеток. Пример такого воздействия на культуру клеток представлен на рис.5. Следует отметить, что при этих условиях уменьшается митотический индекс культуры, на препаратах отмечаются патологические митозы и значительное количество гигантских многоядерных клеток, причем увеличивается количество ядер на клетку (6–8 ядер) — рис.6. Залуживает внимания факт полной деструкции монослоя: на препаратах отсутствуют жизнеспособные клетки и клетки на стадиях деления.

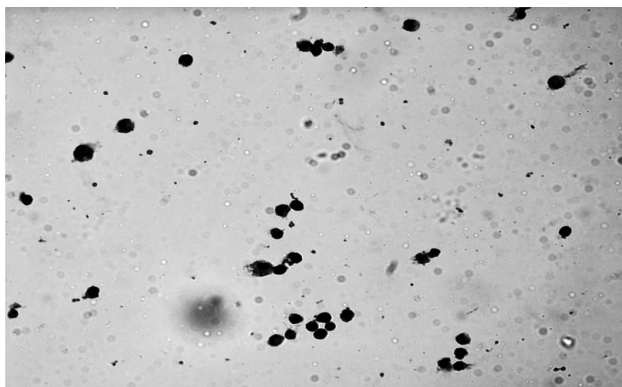


Рис. 5. Структура культуры клеток линии L_{929} при добавлении в питательную среду субретинальной жидкости. Полная деструкция структуры монослоя культуры клеток. В поле зрения отмечаются одиночные клетки округлой формы с очень незначительным количеством цитоплазмы. Ядра клеток гиперхромные. Очень мало митозов. Окрашивание гематоксилин-эозином, увеличение $\times 1000$.

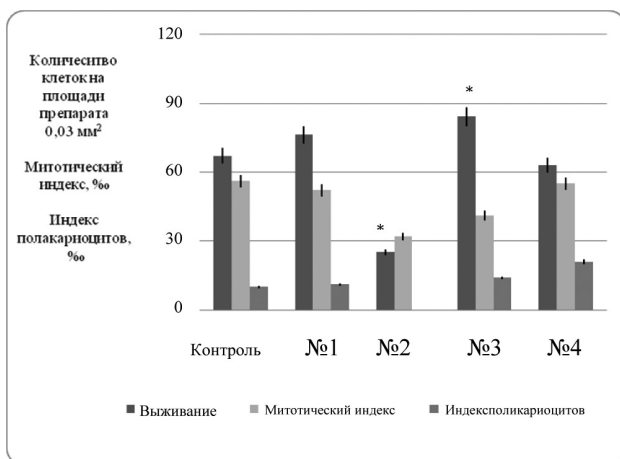


Рис. 6. Показатели жизнедеятельности (пролиферативная активность, митотическая активность и индекс поликардиоцитов) клеток линии L_{929} в условиях совместного культивирования с субретинальной жидкостью у пациентов с отслойкой сетчатки

Примечание: * — достоверность отличий в сравнении с контролем, $p < 0,05$.

Во всех культурах клеток при совместном культивировании с субретинальной жидкостью отмечается статистически достоверное снижение выживаемости (Рис. 7).

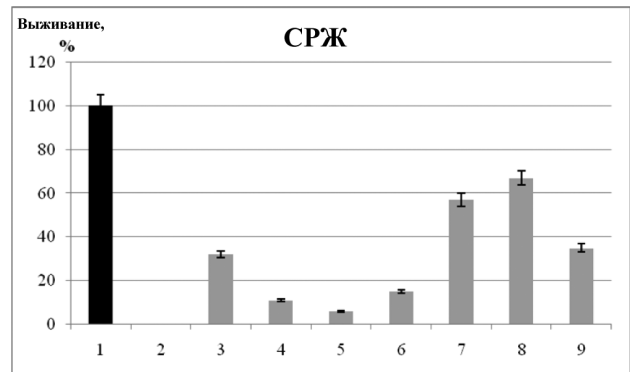


Рис. 7. Выживание клеток линии L_{929} в монослойной культуре в условиях совместного культивирования с субретинальной жидкостью (СРЖ) у пациентов с отслойкой сетчатки (по всем препаратам).

Анализ выживания клеток в интактном контроле и в условиях инкубации клеток со стекловидным телом и субретинальной жидкостью (рис. 8) подтверждает вышесказанное: совместное культивирование с субретинальной жидкостью больше чем в три раза угнетает выживание и жизнедеятельность клеток *in vitro*, тогда как инкубация со стекловидным телом — только на 35 %. При этом следует указать, что в некоторых случаях наблюдалось повышение жизнедеятельности клеток в культуре.

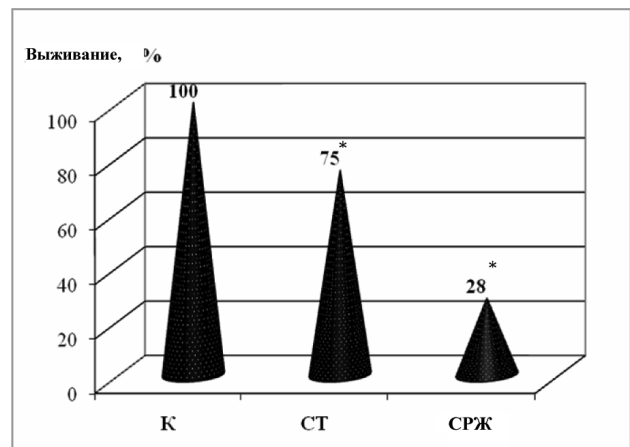


Рис. 8. Выживание клеток линии L_{929} в монослойных культурах в условиях совместного культивирования со стекловидным телом и субретинальной жидкостью при отслойке сетчатки (средние значения по всем исследованиям).

Примечание: * — данные достоверны по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

Определение количества апоптотических клеток в клеточных культурах в условиях совместной инкубации стекловидного тела и субретинальной жидкости показало, что в основном, изменения

индекса апоптоза статистически не достоверны по сравнению с контролем. Однако в некоторых случаях отмечается тенденция к усилению апоптоза при инкубации со стекловидным телом и уменьшению при инкубации с субретинальной жидкостью.

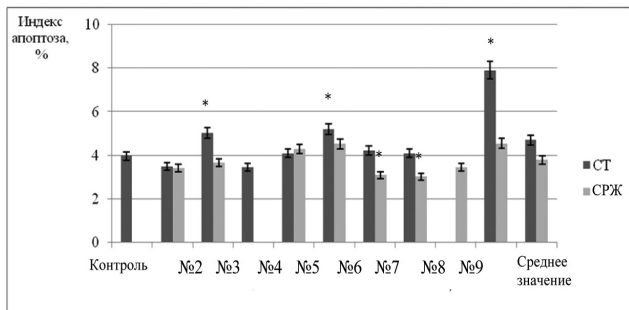


Рис. 9. Апоптоз в культуре клеток линии L₉₂₉ на четвертые сутки культивирования в условиях совместного культивирования со стекловидным телом и субретинальной жидкостью при отслойке сетчатки.

Примечание: * — данные достоверны по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

Ультраструктурные изменения в клетках, приводящие к ограничению морфологического восстановления, могут быть вызваны влиянием микроокружения, то есть омывающих их жидкостей.

Разнонаправленные биологические эффекты стекловидного тела на клеточные культуры связаны с различной степенью пролиферации и связанной с ней концентрацией ростовых факторов.

Субретинальная полость является местом кумуляции белков плазмы хориокапилляров, жидких компонентов стекловидного тела и продуктов жизнедеятельности клеток, которые формируют её стенки — нейро- и пигментного эпителия сетчатки.

Выявленные эффекты влияния субретинальной жидкости на культуру клеток приоткрывают причины неполного восстановления зрительных функций при отслойке сетчатки. Исходя из ее прямого влияния на ядерный аппарат клетки и блокирование развития новых поколений клеток, такое воздействие можно назвать индукцией репродуктивной гибели клеточной популяции.

Предположительно, эти же компоненты могут приводить к гибели части популяции фоторецепторов в отслоенной сетчатке как наиболее активно делящихся клеток. Возможно, такая реакция обусловлена вынужденным блокированием гиперплазии наружных сегментов фоторецепторов и клеток ПЭС.

Подобные изменения фоторецепторов были выявлены при экспериментальной отслойке сетчатки [4, 9]. Авторы отмечают, что клетки фоторецепторов выходили в субретинальное пространство, теряли свой дифференцированный фенотип,

превращаясь в круглые клетки с очень небольшим количеством цитоплазмы.

Выраженное супрессивное влияние субретинальной жидкости делает маловероятной миграцию и пролиферацию клеток в стекловидное тело из субретинальной полости через ретинальный разрыв. Более вероятным источником пролиферации остаются структуры, окружающие стекловидное тело.

ВЫВОДЫ

Инкубация культуры клеток со стекловидным телом приводила к снижению адгезивных свойств клеток, которое проявлялось появлением многослойных формирований, повышением митотической активности. Выживаемость клеток составила 75 % от контроля.

Инкубация клеток с субретинальной жидкостью приводила к деградации монослоя клеток, изменению их формы и появлению многоядерных клеток. В некоторых случаях происходила полная деструкция монослоя вследствие репродуктивной гибели клеток. Выживаемость клеток составила 28 % от контроля.

Полученные данные позволяют трактовать подавление регенерации фоторецепторов при отслойке сетчатки за счет влияния на них компонентов субретинальной жидкости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Запускалов И. В., Кривошеина О. И. О патогенезе пролиферативной витреоретинопатии // Современные технологии лечения витреоретинальной патологии. — М.: МНТК им. С. Н. Федорова, 2002. — С. 110–115.
2. Путиенко А. А. Анализ результатов лечения регматогенной отслойки сетчатки, осложненной передней пролиферативной витреоретинопатией // Офтальмол. журн. — 2003. — № 1. — С. 8–11.
3. Зуева, И. В. Цапенко, М. В. Рябина и др. Роль клеток Мюллера в патогенезе пролиферативных изменений сетчатки // Материалы III Междунар. науч. — практ. конф. «Пролиферативный синдром в офтальмологии». — М., 2004 г. — С. 27.
4. Cook J. B., Lewis G. P., Fisher S. K. et al. Apoptotic photoreceptor degeneration in experimental retinal detachment // Invest. Ophthalmol Vis Sci. — 1995. — V.36. — P.990–996.
5. Hisatomi T., Sakamoto T., Murata T. et al. Relocation of apoptosis inducing factor in photoreceptor apoptosis induced by retinal detachment in vivo // Am. J. Patol. — 2001. — V.158. — P.1271–1278.
6. Steinberg R. H. Research update: Report from a Workshop on Cell Biology of Retinal Detachment // Exp. Eye Res. — 1986. — Vol. 43, № 5. — P. 695–706.
7. Steinberg P. J. Machermer R. Subretinal proliferation // Ophthalmol. — 1984. — Vol. 98, № 4. — P.456–462.
8. Reichenbach A., Bringman A., Mueller cells in the Healthy and Diseased Retina // Springer, 2010. — p. 256.

9. Linberg K. A., Sakai T., Levis G. P. et al. Experimental retinal detachment in the cone dominant ground squirrel: Morphology and basic immunocytochemistry // *Vis. Neurosci.* — 2002. — V.19. — P.603–619.
10. Wilson D. T., Green W. R. Histopathologic study of the effect of retinal detachment surgery on 49 eyes obtained

post mortem // *Am. J. Ophthalmol.* — 1988. — Vol. 103, № 1. — P. 167–179.

Поступила 26.04.2011.

Рецензент д-р мед.наук А. А. Путиенко

THE ROLE OF THE VITREOUS HUMOR AND SUBRETINAL FLUID IN PROLIFERATION PROCESSES IN RETINAL DETACHMENT

A. Sergienko, G. Lavrinchuk, O. Vlasko, L. Lytvynchuk

The aim was to evaluate general content effects of vitreous and subretinal fluid on fibroblast-like cell strain, as model of proliferative processes *in vitro*, and to find out the evidences that proliferative vitreoretinopathy (PVR) development is dependant not only on retinal pigment epithelium migration. For that reason 10 vitreous body aspirates and 9 subretinal fluid samples, taken during PPV in patients with retinal detachment, were added to cell strain L₉₂₉ which obtains an ability to proliferate permanently. Cellular effects were evaluated according to cellular vital activity indices changes: survival, mitotic index and polycaryocyte index. Vitreous aspirates have induced cellular adhesion decrease and increase of mitotic activity. Subretinal fluid samples have reduced cellular reproducibility of the cell strain. Data analysis revealed the ability of subretinal fluid content to depress cellular reproducibility. On the contrary vitreous content revealed the ability to stimulate cellular mitosis and proliferation. Given results suggest that there is a favorable environment existence in vitreous cavity for PVR development.



УДК: 617.7+616-07+616-001+616.831

ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ТОПІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ УРАЖЕНЬ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ПРИ ЛЕГКІЙ ЧЕРЕПНО-МОЗКОВІЙ ТРАВМІ ЗА ДАНИМИ ВИЗНАЧЕННЯ ХАРАКТЕРУ ОКОРУХОВИХ РЕАКЦІЙ

Н. М. Мойсеєнко, канд. мед. наук

ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет», Івано-Франківськ

ВСТУП. Впродовж останніх десятиліть збільшилась частота скарг на двоїння в очах, больові відчуття в ділянці очей, дискомфорт при читанні у людей, які перенесли закриту черепно-мозкову травму [11]. Як відомо, вказані порушення можуть виникати в результаті травмувань очорухового апарату [7]. Самостійне звернення хворих, як правило, у віддалений після травми період знижує ефективність усіх сучасних лікувальних заходів. Діагностика ж ушкоджень очорухового апарату в більш ранній термін після травми утруднена через їх скритий перебіг, невеликі кути косоокості і незначне обмеження рухомості очних яблук, яке не виявляється під час скринінгового обстеження. Можливості комп'ютерної і магнітнорезонансної томографії також обмежені, оскільки вогнища уражень, особливо вторинні, формуються не відразу, а тому часто виникає потреба повторних обстежень [3].

Можливості топічної діагностики уражень головного мозку при різних патологічних станах на підставі очорухових реакцій, за даними літератури, мають велике значення [8, 14]. Її застосування спрощує пошуки зони ураження. Якщо в подальшому виникає потреба комп'ютерної чи магніто-

резонансної томографії [12], то обстеження стає більш прицільним, що збільшує імовірність виявлення патологічного вогнища, а отже, і можливість його ліквідації (рис. 1).

Відомо, що кора і підкіркові зони головного мозку відіграють різну і високо специфічну роль в забезпеченні очорухових функцій. Задньо-тім'яна доля (рис. 2), наприклад, забезпечує фіксацію погляду, повільне слідкування за об'єктом і сакадичні рухи. Її асоціаційні нейрони активуються, коли увага спрямовується на специфічний для неї об'єкт [13]. Середня і середньо-верхня скронева зона відповідають за рухову чутливість (перцепцію) і фракційні (персистуючі) рухи очей. Потилична зорова зона (первинний центр зору, VI шар 17 поля за Бродманом), є відправною точкою для всіх зорових процесів, а тому відіграє визначну роль в зоровому сприйнятті рухів очей. Супплементарне очне поле, розташоване в дорсомедіальній ділянці лобної доли (6 поле за Бродманом), відіграє роль у плануванні вольових рухів очей. Лобне очне поле, яке включає 8 і взаємодіє із 6, 4 та 9 полями за Бродманом,

© Н. М. Мойсеєнко, 2011