

## ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАНИЯ МЕСТНООБЕЗБОЛИВАЮЩЕГО ВЕЩЕСТВА РУ-1117 С ВИЗИТОНОМ-ПЭГ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ ЭНДОТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ ПРИ ПЕРЕДНЕКАМЕРНОЙ АНЕСТЕЗИИ ГЛАЗА

**А. В. Киселев, П. А. Галенко-Ярошевский, С. Н. Сахнов, А. Г. Заболотный, Е. Ю. Кириченко, А. К. Логвинов**

*Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова, Краснодар, Научно-исследовательский институт нейрокибернетики им. А. Б. Когана, Ростов-на-Дону*

Проведено электронномикроскопическое исследование эндотелия роговицы через 1 и 24 ч после введения в переднюю камеру глаза кроликов сочетания РУ-1117 (0,05%) с 1 % визитон-ПЭГ (В-ПЭГ) и В-ПЭГ (взятый отдельно). Установлено, что спустя 1 ч композиция РУ-1117+В-ПЭГ не вызывает значимых структурных изменений, тогда как В-ПЭГ в «чистом» виде индуцирует пролиферацию гладкого и шероховатого эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи, а также расширение наружного и внутреннего пространства кариолеммы. Через 24 ч РУ-1117+В-ПЭГ вызывает отек цитоплазматического матрикса, расширение мембран цитоплазматической сети, пролиферацию пластинчатых комплексов, которые носят обратимый характер, а В-ПЭГ — лизис органоидов цитоплазмы и частичное отслоение эндотелия от десцеметовой мембраны.

*Ключевые слова:* переднекамерная анестезия глаза, эндотелий роговицы, РУ-1117, визитон-ПЭГ, электронная микроскопия.

## EFFECT OF COMBINATION LOCAL ANESTHETIC RU -1117 WITH VISITON-PEG IN ANTERIOR CHAMBER ON ENDOTHELIAL ULTRASTRUCTURE

**A. V. Kiselyov, P. A. Galenko-Yaroshevsky, S. N. Sakhnov, A. G. Zabolotny, E. Y. Kirichenko, A. K. Logvinov**

Electron microscopic research of corneal endothelial ultrastructure after installation in anterior chamber of a combination of RU-1117 (0,05 %) + visiton-PEG (V-PEG) and V-PEG (apart) after 1 and 24 hours upon insertion. It was established that 1 hour exposure to RU-1117 (0,05 %) + V-PEG did not induce any significant structural changes unlike V-PEG, which was administered on its own. 24-hour exposure to V-PEG in anterior endothelial chamber induced convertible damages with lysis of intracellular structures, while the combination RU-1117 (0,05 %) + V-PEG induced reversible changes in the endothelium.

*Key words:* electron microscopy of corneal endothelium, RU-1117, visiton-PEG, ocular anterior chamber anesthesia.

Все чаще во время офтальмологических операций хирургам приходится прибегать к использованию терминальной (эпibuльбарной, переднекамерной) анестезии глаза. Это нередко обусловлено увеличением количества пациентов, страдающих сопутствующими заболеваниями, которые не всегда позволяют проводить общее обезболивание. В таких ситуациях применение topical-анестезии, включая переднекамерную, является безопасным и оправданным методом, так как позволяет избежать в послеоперационном периоде таких осложнений как птоз, диплопия, нарушение слезообразования и др. Зрительные функции после использования переднекамерного обезболивания восстанавливаются значительно быстрее (как правило в течение 4 ч), что позволяют выписывать пациентов в более ранние сроки после оперативного вмешательства [1, 2].

В настоящее время единственным местным анестетиком для переднекамерного обезболивания глаза является 1%-й раствор лидокаина. Несмотря на то, что лидокаин обычно хорошо переносится пациентами, он

не обеспечивает достаточной глубины и продолжительности анестезии, что нередко вынуждает хирурга к его повторному введению.

Кроме того, известно, что при проведении многих офтальмологических операций с проникновением в переднюю камеру в нее вводится вискоэластик, в частности В-ПЭГ, для поддержания объема и защиты эндотелия роговицы от повреждения.

Ранее нами было показано, что производное имидазо[1,2-а]бензимидазола РУ-1117 (лабораторный шифр), приготовленное на 1%-м растворе вискоэластика В-ПЭГ (протектор эпителия гелевый) вызывает глубокую и продолжительную эпibuльбарную и, особенно, переднекамерную анестезию, значительно превосходя в этом отношении лидокаин и инокаин [4].

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Исследование влияния композиции РУ-1117+В-ПЭГ и В-ПЭГ, взятого для сравнения, на ультраструктуру эндотелия роговицы при переднекамерной анестезии глаза.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Для электронномикроскопического исследования проводили аутопсию роговицы у 5 групп кроликов: 1-я группа — контрольная (интактные животные); 2, 3, 4 и 5-я — подопытные: 2-й и 3-й, 4-й и 5-й группам вводили в переднюю камеру глаза соответственно В-ПЭГ и РУ-1117+В-ПЭГ, при этом у 2-й и 3-й групп забор роговицы проводили через 1 ч, а у 4-й и 5-й — через 24 ч после введения.

Процесс обработки роговиц для электронномикроскопического исследования состоял из стандартных этапов: фиксации, промывки, обезвоживания, пропитки и заливки (Robenson, Gray, 1990, Bozzola, Russell, 1992). Ультратонкие срезы толщиной 70 нм изготавливали на ультрамикротоме Ultracut-E (Leica, Германия) с использованием алмазного ножа Diamont (Швейцария), затем их контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали в трансмиссионном просвечивающем электронном микроскопе Jem 1011 (Jeol, Япония), оснащённом цифровой камерой Erlangshen ES500W (Gatan, США). Запись электронограмм производилась с увеличением от ?12 000 до ?50 000. Результаты получали в абсолютных единицах измерения — микронах и нанометрах. Анализ изображений проводили с использованием лицензированных программ Qwin (Leica, Кембридж Англия) и Application Suite (Leica, Швейцария).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На полутонких срезах роговицы глаза кроликов контрольной группы, окрашенных метиленовым синим, определялась пятислойная структура роговицы: клетки переднего многослойного эпителия, боуменова мембрана, строма, десцеметова мембрана и клетки эндотелия (рис. 1).

На электронограммах (рис. 2—5) представлена ультраструктура роговицы контрольной группы животных, которая во всех слоях имеет нормальное строение.

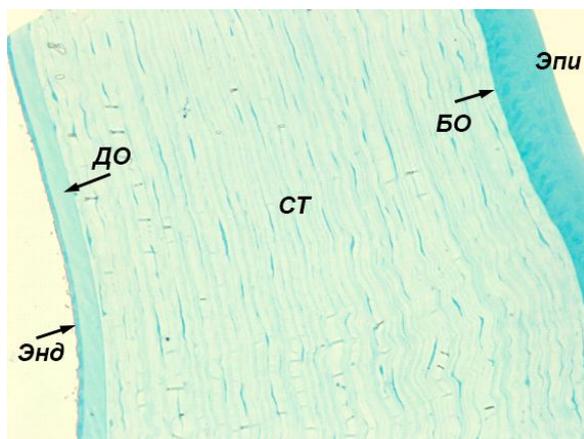


Рис. 1. Полутонкий срез роговицы, окрашенный метиленовым синим и эозином контрольной группы животных. Эпи — эпителий, БО — боуменова оболочка, СТ — строма, ДО — десцеметова оболочка, Энд — эндотелий. Увеличение  $\times 400$

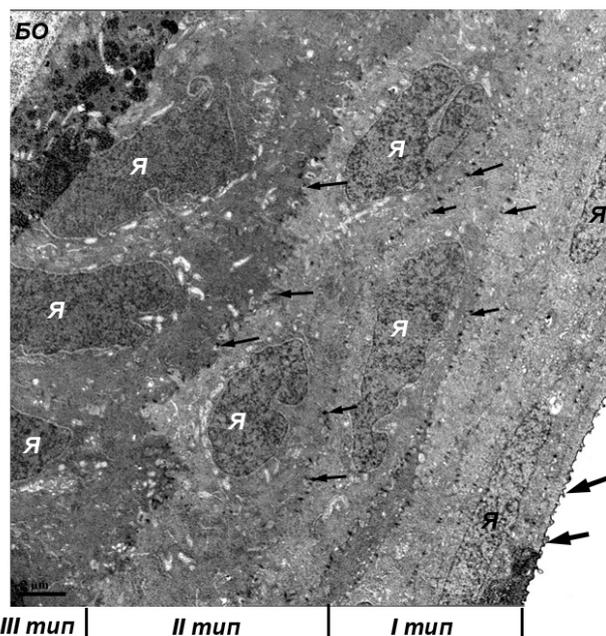


Рис. 2. Ультраструктура переднего эпителия роговицы кролика контрольной группы. Отмечаются клетки различного типа: I тип — слой уплощенных клеток, II тип — слой многоотростчатых клеток, III тип — слой герминативных клеток. Я — ядро, БО — боуменова оболочка, тонкими стрелками обозначены межклеточные контакты — гемидесмосомы, толстыми — ворсины переднего эпителия. Увеличение  $\times 10\ 000$

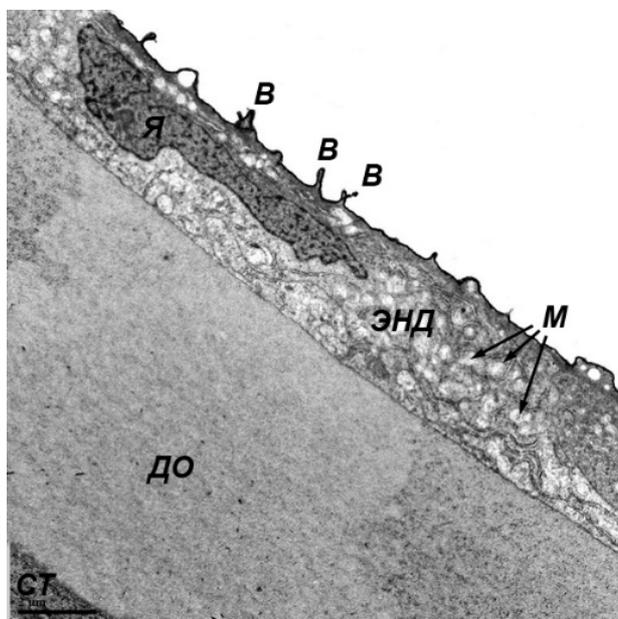


Рис. 3. Ультраструктура внутренних слоев роговицы глаза кролика контрольной группы. Энд — эндотелий роговицы, В — ворсины эндотелия, Я — ядро эндотелиальной клетки, М — митохондрии, ДО — десцеметова оболочка, СТ — строма. Увеличение  $\times 12\ 000$

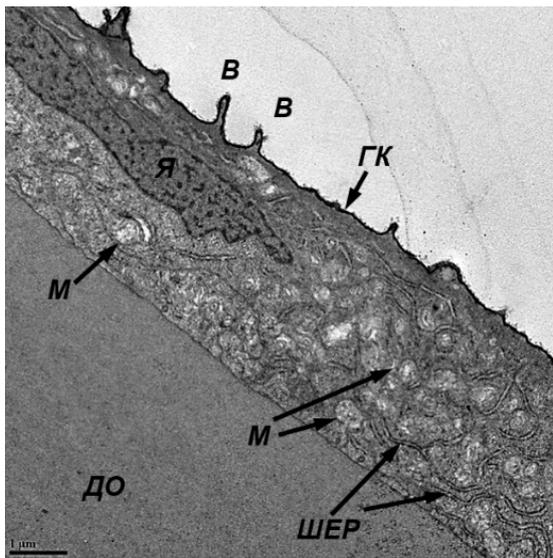


Рис. 4. Ультраструктура эндотелия роговицы глаза кролика контрольной группы. В — ворсины эндотелия, Я — ядро эндотелиальной клетки, М — митохондрии, ДО — десцеметова оболочка, ШЕР — шероховатый эндоплазматический ретикулум, ГК — гликокаликс. Увеличение × 20 000

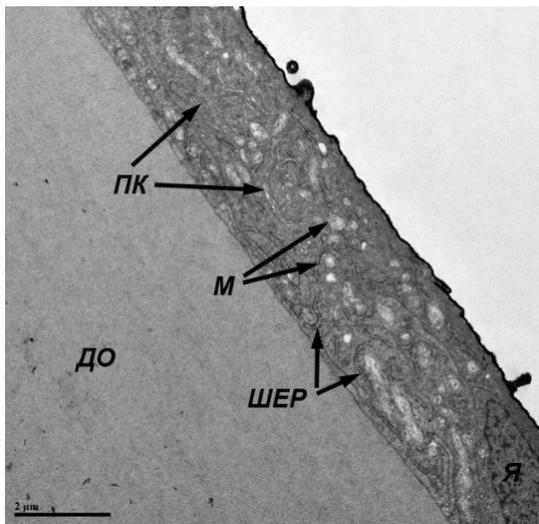


Рис. 5. Ультраструктура эндотелия роговицы глаза кролика контрольной группы. Я — ядро эндотелиальной клетки, М — митохондрии, ДО — десцеметова оболочка, ШЕР — шероховатый эндоплазматический ретикулум, ПК — пластинчатый комплекс. Увеличение × 25 000

В ультраструктурных исследованиях эндотелия роговицы кролика через 1 ч после введения в переднюю камеру В-ПЭГ выявлены незначительные патологические изменения эндотелиоцитов, носящие обратимый характер. Так, на рис. 7 в эндотелии визуализируется крупное протяженное ядро с извитыми контурами, ядерная мембрана не нарушена, наблюдается небольшое расширение каналов шероховатого эндоплазматического ретикулума, эндотелий плот-

но прилегает к десцеметовой оболочке, что свидетельствует об отсутствии видимых изменений (рис. 6, 7).

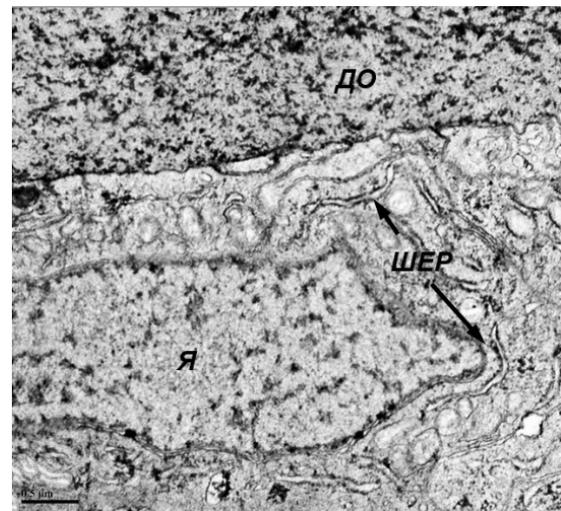


Рис. 6. Ультраструктура эндотелия через 1 ч после введения в переднюю камеру глаза В-ПЭГ. Я — ядро эндотелиальной клетки, ДО — десцеметова оболочка, ШЕР — шероховатый эндоплазматический ретикулум. Увеличение × 30 000

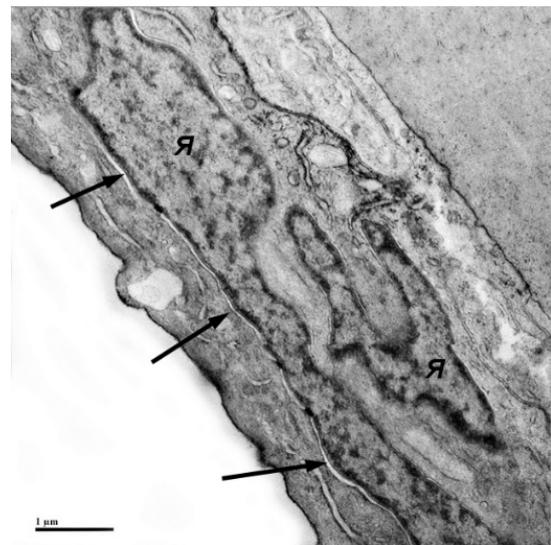


Рис. 7. Расширение перинуклеарного пространства (указано стрелками), вакуолизация эндотелия через 1 ч после введения в переднюю камеру глаза В-ПЭГ. Я — ядро эндотелиальной клетки. Увеличение × 50 000

Помимо развитых каналов гладкого и шероховатого эндоплазматического ретикулума, наблюдается пролиферация пластинчатых комплексов или аппаратов Гольджи в виде широких уплощенных цистерн в комбинации с множеством разнообразных пузырьков.

На нескольких электронограммах обнаруживаются более существенные изменения: в непосредственной близости визуализируются два ядра эндотелиальных клеток вытянутой округлой формы, при этом наблюдается расши-

рение наружного и внутреннего перинуклеарного пространства за счет отслоения наружного листа кариолеммы. Кроме этого визуализируется расширение эндоплазматического ретикулума как гладкого, так и шероховатого (рис. 7).

При ультраструктурном исследовании эндотелия роговицы кролика через 1 ч после введения в переднюю камеру композиции РУ-1117+В-ПЭГ наблюдалась пролиферация гликокаликса, а также наличие крупных вакуолей со стороны передней камеры. Так, на рис. 8 представлены две округлые вакуоли, по-видимому, сформированные в результате пиноцитоза. Отмечено, что более мелкая вакуоль располагается внутри эндотелиоцита, в то время как вторая, более крупная располагается снаружи и окружена гликокаликсом (рис. 8).

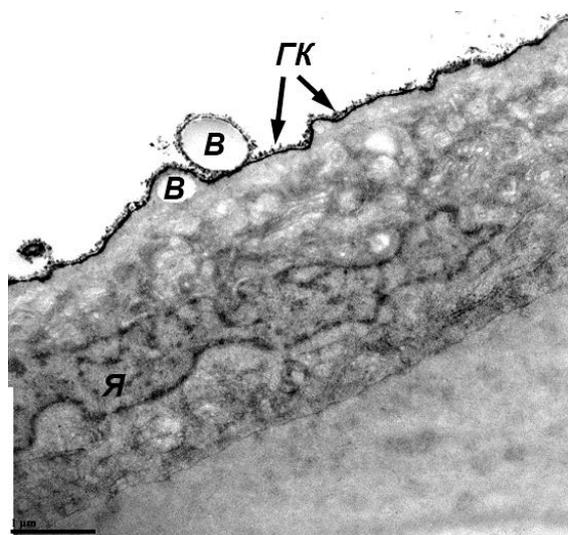


Рис. 8. Проллиферация гликокаликса (ГК) и вакуолизация (В) эндотелия роговицы через час после введения в переднюю камеру РУ-1117 (0,05%) + В-ПЭГ. Я — ядро эндотелиальной клетки. Увеличение  $\times 40\ 000$

При ультраструктурном исследовании эндотелия роговицы через 24 ч после введения в переднюю камеру глаза В-ПЭГ картина нормального строения эндотелия значительно меняется. На рис. 9 в эндотелии определяются фрагменты двух ядер с отслоением перинуклеарного пространства, межклеточные контакты разрушены, при этом наблюдается лизис внутриклеточных органоидов цитоплазмы и частичное отслоение эндотелия в месте прикрепления к десцеметовой оболочке.

Отмечается развитый электронноплотный хлопьевидный гликокаликс, размеры которого значительно увеличены (рис. 9). Аналогичная картина была отмечена и на других электронограммах данной группы опытов. Особого внимания заслуживают мощные цитоплазматические выросты на апикальной поверхности эндотелия — микроворсинки, значительно увеличивающие площадь плазматической мембраны эпителия. При увеличении 80 000 развитые микроворсинки имеют вид тонких пальцевидных образований, по всему периметру окруженные хлопьями гликокаликса.

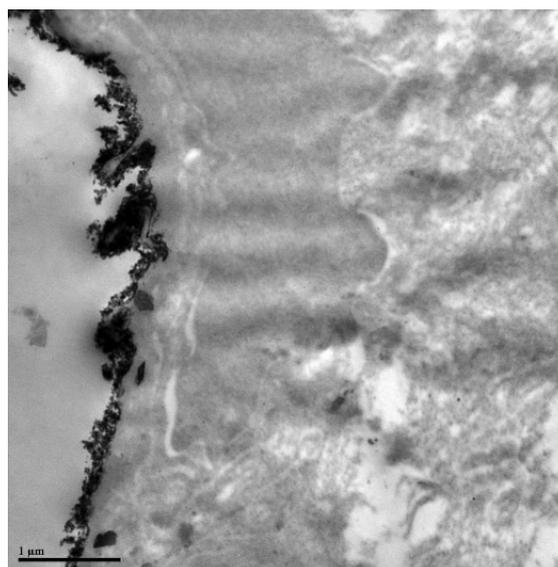


Рис. 9. Ультраструктура эндотелия роговицы через 24 часа после введения в переднюю камеру глаза В-ПЭГ. Увеличение  $\times 50\ 000$

Через 24 ч после введения животным в переднюю камеру глаза сочетания РУ-1117+В-ПЭГ наблюдались следующие изменения ультраструктуры эндотелия роговицы: наличие вакуолей в цитоплазме, расширение цистерн гладкого и шероховатого эндоплазматического ретикулума, пролиферация пластинчатых комплексов. Отмечено также небольшое расширение перинуклеарного пространства. При этом наблюдалась сохранность контактов между эндотелием и десцеметовой оболочкой, микроворсин, а также основных цитоплазматических органелл (рис. 10, 11).

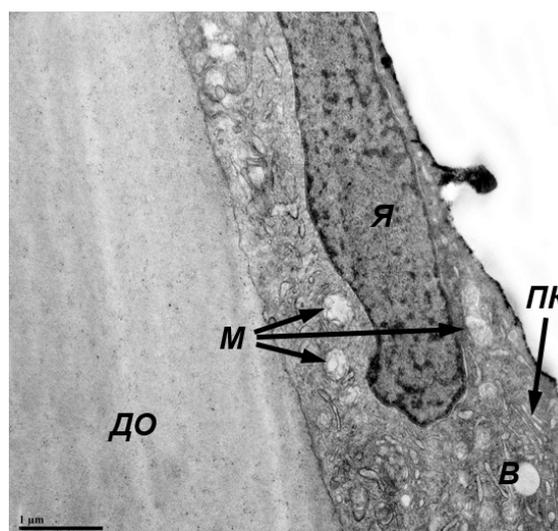


Рис. 10. Сохранность внутриклеточных органелл эндотелия роговицы через 24 ч после введения в переднюю камеру глаза РУ-1117+В-ПЭГ. Я — ядро эндотелиальной клетки, ДО — десцеметова оболочка, В — вакуоль, ПК — пластинчатый комплекс. Увеличение  $\times 40\ 000$

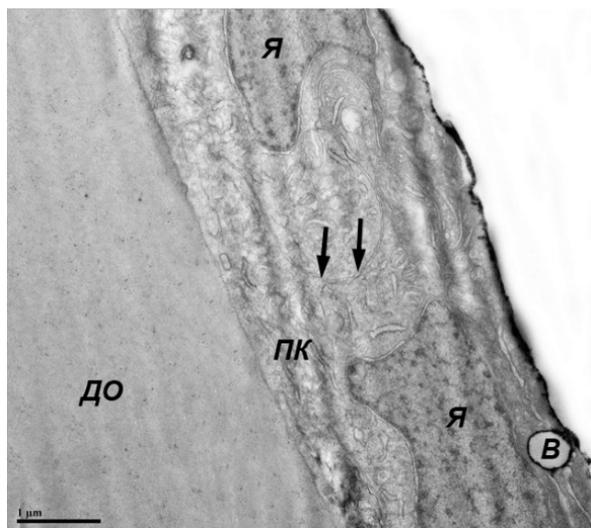


Рис. 11. Сохранность межклеточных контактов, пролиферация пластинчатых комплексов, эндотелия роговицы через 24 ч после введения в переднюю камеру РУ-1117+В-ПЭГ. Я — ядро эндотелиальной клетки, ДО — десцеметова оболочка, В — вакуоль, ПК — пластинчатый комплекс; стрелками указан межклеточный контакт. Увеличение  $\times 40\ 000$

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при электронномикроскопическом исследовании эндотелия роговицы кролика через 1 ч после введения В-ПЭГ в переднюю камеру в цитоплазме отмечается появление вакуолей среднего и большого размера, пролиферация гладкого и шероховатого эндоплазматического ретикулума, пролиферация пластинчатого комплекса, расширение наружного и внутреннего пространства кариолеммы. Остаются сохранными органеллы, межклеточные контакты, ворсины, а также гемидесмосомы между эндотелием и десцеметовой оболочкой, что указывает на обратимость выявленных изменений.

При ультраструктурном исследовании эндотелия роговицы через 1 ч после введения в переднюю камеру композиции РУ-1117+В-ПЭГ имеет место пролифера-

ция гликокаликса, а также наличие вакуолей со стороны, обращенной к передней камере.

Через 24 ч после введения в переднюю камеру В-ПЭГ возникают необратимые изменения эндотелия роговицы.

При исследовании эндотелия роговицы через 24 ч после введения в переднюю камеру композиции РУ-1117+В-ПЭГ возникает отек цитоплазматического матрикса, расширение мембран цитоплазматической сети, пролиферация пластинчатых комплексов, невыраженная вакуолизация цитоплазмы. Нарушение строения митохондрий, межклеточных плотных и щелевых контактов, связи клеток с десцеметовой оболочкой и их отслоение отсутствуют.

Сочетание РУ-1117+В-ПЭГ, по сравнению с В-ПЭГ, взятым отдельно, обладает значительно меньшим повреждающим действием на эндотелий роговицы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимова С. Ю., Анисимов С. И., Кояндер Ю. П. // Современные технологии хирургии катаракты: Сб. науч. тр. — М., 2002. — С. 21—28.
2. Бакунина Н. А., Иванов И. Л. Рациональный метод местной анестезии в офтальмологии // VIII Всерос. научно-практ. конф. с межд. участием «Федоровские чтения — 2009»: Сб. науч. статей / ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза». — М., 2009. — С. 322—323.
3. Карданова Л. О., Джабер Н. А., Чукуевский М. В., Кунижев Б. М., Романенко Б. В. Преимущества без инъекционной анестезии в амбулаторной офтальмохирургии // Современные технологии хирургии катаракты: Сб. науч. тр. — М., 2002. — С. 155—161.
4. Киселев А. В., Галенко-Ярошевский П. А., Сахнов С. Н. // Новые технологии. — 2012. — № 4. — С. 294—298.

## Контактная информация

**Киселев А. В.** — кафедра фармакологии, Кубанский государственный медицинский университет, e-mail: kybfarma@rambler.ru