

Электронно-микроскопические изменения сетчатки после хромовитрэктомии с использованием комбинированных красителей (экспериментальное исследование)

Б.М. Азнабаев^{1,2}З.Р. Янбухтина^{*1,2}Т.Р. Мухамадеев^{1,2}Т.И. Дибеев^{1,2}Г.Р. Шакирова³

¹ ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
ул. Ленина, 3, Уфа, 450008, Российская Федерация

² ЗАО «Оптимервис»
ул. 50 лет СССР, 8, Уфа, 450059, Республика Башкортостан

³ ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии —
МВА имени Н.И. Скрыбина»
ул. Академика Скрыбина, 23, Москва, 109472, Российская Федерация

РЕЗЮМЕ

Офтальмология. 2018;15(1):43-50

Цель: изучить на экспериментальной модели электронно-микроскопические изменения сетчатки при окрашивании заднего сегмента глаза комбинированными красителями на основе Trypan blue и Brilliant blue G для оценки безопасности их применения. **Методы.** Исследование выполнено на кроликах породы шиншилла. В качестве окрашивающих агентов были использованы комбинированные красители на основе Trypan blue и Brilliant blue G: MembraneBlue-Dual (производитель DORC, Нидерланды) и «Раствор окрашивающий для офтальмологической хирургии» (ЗАО «Оптимервис», Россия). Использовали стандартную методику витрэктомии с трехпортовым доступом. После удаления стекловидного тела в витреальную полость, заполненную физиологическим раствором, вводили краситель, который после 10-секундной экспозиции вымывали. Тампонаду витреальной полости выполняли физиологическим раствором. Электронно-микроскопические исследования проводили на 5, 14 и 30-е сутки после операции. Энуклеацию выполняли через 20 минут после вывода животного из эксперимента. Контролем служили интактные парные глаза кроликов, образцы готовили параллельно, в строго идентичных условиях. Оценивали нарушение архитектоники сетчатки и наличие внутриклеточных включений. **Результаты.** Выявлен стадийный характер патоморфологических изменений. На 5-е сутки отмечались умеренно выраженные проявления в виде отека и гидропической дистрофии нейронов. На 14-е сутки установлено отсутствие негативной динамики. На 30-е сутки признаки отека и дистрофии нейронов практически исчезли, что свидетельствует о принципиальной обратимости выявленных изменений. **Заключение.** Исследуемые вещества для окрашивания внутриглазных структур на основе Trypan blue и Brilliant blue G не вызывали существенных гистоморфологических изменений и токсического воздействия на ретинальные клеточные структуры при интравитреальном применении. Все обнаруженные электронно-микроскопические изменения имели незначительный обратимый характер и могли быть обусловлены в большей степени операционной травмой.

Ключевые слова: хромовитрэктомия, краситель, сетчатка, визуализация тканей, электронная микроскопия

Для цитирования: Азнабаев Б.М., Янбухтина З.Р., Мухамадеев Т.Р., Дибеев Т.И., Шакирова Г.Р. Электронно-микроскопические изменения сетчатки после хромовитрэктомии с использованием комбинированных красителей (экспериментальное исследование). *Офтальмология*. 2018;15(1):43-50. DOI: 10.18008/1816-5095-2018-1-43-50

Прозрачность финансовой деятельности: Никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах

Конфликт интересов отсутствует



Electron Microscopic Changes of Rabbit Retina after Chromovitrectomy Using Combined Dyes (Experimental Study)

B.M. Aznabaev^{1,2}, Z.R. Yanbukhtina*^{1,2}, T.R. Mukhamadeev^{1,2}, T.I. Dibaev^{1,2}, G.R. Shakirova³

¹ Bashkir State Medical University
Lenina str., 3, Ufa, 450008, Republic of Bashkortostan, Russia

² JCS "Optimedservis"
50 let SSSR str., 8, Ufa, 450059, Republic of Bashkortostan, Russia

³ Scriabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology
Akademika Skryabina str., Moscow, 109472, Russia

ABSTRACT

Ophthalmology in Russia. 2018;15(1):43–50

Purpose: to evaluate on experimental model electron-microscopic changes of rabbit retina after staining of the posterior eye segment with combined dyes based on Trypan blue and Brilliant blue G for the assessment of their safety. **Methods.** The study was performed on Chinchilla breed rabbits. Combined dyes based on Trypan blue and Brilliant blue were used: MembraneBlue-Dual (DORC, Netherlands) and "Staining solution for ophthalmic surgery" (JCS "Optimedservis", Russia). Standard three-port vitrectomy technique was used. After vitreous removal dyes were injected in vitreous cavity and exposed for 10 seconds and then removed. The vitreous cavity was filled by a balanced salt solution. An electron-microscopic evaluation was performed on 5, 14 and 30 days after surgery. Eyes were enucleated in 20 minutes after animal was killed by air embolization. Intact eyes were used as a control, all samples were prepared in same conditions. The damage of the retina architectonics and the presence of intracellular inclusions were evaluated. **Results.** The staged character of pathomorphological changes was revealed. On the 5th day moderate edema and hydropic dystrophy of neurons were registered. On the 14th day, there was no negative dynamics. On day 30, the signs of edema and dystrophy of neurons practically disappeared, which may indicate a fundamental reversibility of the registered changes. **Conclusion.** Investigated dyes for staining intraocular structures based on Trypan blue and Brilliant blue did not cause significant histomorphological changes and toxic effects on retinal cell structures. Detected electron microscopic changes were insignificant, had reversible character and could be mostly caused by a surgical injury.

Keywords: chromovitrectomy, dye, retina, visualization of tissues, electron microscopy

For citation: Aznabaev B.M., Yanbukhtina Z.R., Mukhamadeev T.R., Dibaev T.I., Shakirova G.R. Electron Microscopic Changes of Rabbit Retina after Chromovitrectomy Using Combined Dyes (Experimental Study). *Ophthalmology in Russia*. 2018;15(1):43–50. DOI: 10.18008/1816-5095-2018-1-43-50

Financial Disclosure: No author has a financial or property interest in any material or method mentioned

There is no conflict of interests

ВВЕДЕНИЕ

Визуализация и идентификация внутриглазных структур является одной из основных составляющих успешной витреоретинальной хирургии [1]. Хромовитректомию подразумевает избирательный подбор эндо-вitreальных красителей для окрашивания структур заднего отдела глаза, создает полезный контраст края удаляемых структур, расширяет идентификацию истинных границ патологических мембран, позволяет оперировать пациентов на более ранних стадиях заболевания при меньшем травматизме^{1,2,3} [2–4].

В настоящее время бесспорным является тот факт, что использование красителей значительно облегчает витреоретинальные вмешательства на полупрозрачных структурах: задней гиаловидной мембране (ЗГМ), эпиретинальных мембранах (ЭРМ) и внутренней пограничной мембране (ВПМ). Проведение хромовитректомии направлено на получение максимальной визуальной

идентификации удаляемых структур при использовании минимальной нетоксичной концентрации и объема используемого красителя¹ [5, 6].

Методика хромовитректомии применяется достаточно широко и в последние 10 лет стала стандартной процедурой для большинства витреоретинальных хирургов [7].

Комбинированные красители на основе Трупан blue (ТВ) и Brilliant blue G (BBG) относятся к новому поколению интравитреальных красителей, которые обеспечивают достаточно высокую степень окрашивания как внутренней пограничной мембраны, так и эпиретинальных мембран при минимальной концентрации и объеме [1, 7–9]. В то же время дискуссионным остается вопрос возможного токсического действия красителей на различные структуры сетчатки [10].

Трупан blue имеет хорошие красящие свойства и длительный успешный опыт применения, однако имеются сообщения о его потенциальной токсичности в отношении различных ретинальных клеточных элементов³ [11–13]. BBG, также известный как кислотный синий 90

- 1 Haritoglou C. Chromosurgery. *The 9th EURETINA Congress*. France, Nice, 2009:5–7.
- 2 Mieler W. The use corticosteroids and vital dyes in vitreoretinal surgery. *The 9th EURETINA Congress*. France, Nice, 2009. p. 2–6.
- 3 Meyer C. Vital dyes in vitreoretinal surgery — chromovitrectomy // *Developments in Ophthalmology*. Karger, 2008. p. 6.

Б.М. Азнабаев, З.Р. Янбухтина, Т.Р. Мухамадеев, Т.И. Дибеев, Г.Р. Шакирова

Контактная информация: Янбухтина Зия Раилевна zoptimed@mail.ru

или Coomassie BBG, используется в витреоретинальной хирургии с 2006 года [1, 14–16]. Данный краситель характеризуется специфической особенностью избирательного окрашивания именно ВПМ, обладает высоким профилем безопасности, позволяя добиться хорошего анатомического и функционального послеоперационного результата [17, 18]. В то же время BBG плохо окрашивает ЭРМ, но в сочетании с Trypan blue может успешно использоваться для окрашивания и ЭРМ, и ВПМ одновременно [8, 19].

Цель исследования состояла в изучении электронно-микроскопических изменений сетчатки в условиях экспериментальной модели при окрашивании заднего отдела глаза комбинированными красителями на основе Trypan blue (ТВ) и Brilliant blue G (BBG) для оценки безопасности их применения.

МЕТОДЫ

Исследования выполняли на кроликах породы шиншилла. Животные массой от 2,5 до 3,5 кг, в возрасте 4–6 месяцев, содержались в стандартных, строго идентичных условиях. Эксперименты проводили с соблюдением общепринятых принципов гуманности и существующих международных нормативных документов и инструкций МЗ РФ и РАМН, Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным [20]. В качестве окрашивающих агентов были использованы комбинированные красители на основе ТВ и BBG: MembraneBlue-Dual (содержит два красителя: ТВ 0,15% и BBG 0,025%, а также полиэтиленгликоль (ПЭГ) 4% для уменьшения растекания раствора) (DORC, Нидерланды) и «Раствор окрашивающий для офтальмологической хирургии» (ЗАО «Оптимедсервис», Россия). Основу красителя «Раствор окрашивающий для офтальмологической хирургии» составляют два красящих компонента: ТВ 0,13% и BBG 0,020%. Для повышения вязкости раствора с целью уменьшения диффузии и растекания в состав включены ПЭГ 2% и гиалуронат натрия 0,3%.

Экспериментальные операции выполняли под наркозом с использованием препарата «Золетил 100» из расчета 15 мг на 1 кг веса животного (в среднем 0,3–0,4 мл на животное). Проводили трехпортовую субтотальную витрэктомию с помощью универсальной офтальмологической системы «Оптимед Профи» (частота резов 6000 рез./мин), после чего в среде физиологического раствора в витреальную полость вводили 0,1 мл красителя с равномерным распределением по поверхности сетчатки заднего полюса глаза.

В первой группе ($n = 10$) использовали краситель MembraneBlue-Dual, во второй группе ($n = 10$) — «Раствор окрашивающий для офтальмологической хирургии». После 10-секундной экспозиции краситель вымывали методом пассивной аспирации. Для панорамной визуализации применяли контактную линзу и инвертор, установленный на операционный микроскоп, а также систему эндоиллюминации.

Тампонаду витреальной полости выполняли физиологическим раствором. В течение 7 дней после оперативного вмешательства в конъюнктивальную полость животных инстиллировали глазные антибактериальные и нестероидные противовоспалительные препараты (0,5%-ный моксифлоксацин и 0,1%-ный индометацин).

Электронно-микроскопические исследования проводили на 5, 14 и 30-е сутки эксперимента. Животных выводили из эксперимента посредством воздушной эмболии, энуклеацию выполняли через 20 минут. В качестве контроля использовали интактные парные глаза кроликов, образцы для электронно-микроскопических исследований готовили параллельно в идентичных условиях.

Для электронно-микроскопического исследования образцы ткани сетчатки фиксировали в растворе 2%-го глутарового альдегида на фосфатном буфере Миллони-га (рН 7,2–7,4) в течение 2 часов, отмывали в трех порциях того же буфера. Затем фиксировали в 1%-ном растворе четырехоксида осмия (приготовленном на фосфатном буфере Миллони-га, рН 7,2–7,4) — 1 час. Обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и абсолютном ацетоне. Заливку проводили в эпон-812 по общепринятой методике⁴. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме LKB-III (Швеция), контрастировали 2%-ным водным раствором уранилацетата и раствором цитрата свинца по Рейнольдсу [21]. Срезы изучали с помощью электронной микроскопии (JEM-CX II, Япония) при увеличении от 2500 до 15 000.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Через 5 дней после операции в обеих группах выявляли умеренно выраженные изменения. Под плотной полосой внутренней глиальной мембраны хорошо просматривались широкие ножки мюллеровых глиоцитов. Цитоплазма глиальных элементов выглядела несколько уплотненной. В ганглиозном слое большинство ганглиозных нейронов с крупными округлыми ядрами содержали в цитоплазме значительное количество рибосом и полирибосом, множество вытянутых каналов гранулярного эндоплазматического ретикулума, которые формировали скопления — тельца Ниссля, пластинчатый комплекс Гольджи, округлые митохондрии с тонкими кристами.

Отдельные ганглиозные нейроны проявляли признаки отека в виде светлых вакуолей на месте митохондрий, расширения каналов гранулярного эндоплазматического ретикулума, разрежения цитоплазмы, слабого расширения перинуклеарного пространства (рис. 1, 2).

Скопление отростков нейронов во внутреннем ядерном слое и глиальных элементов выглядело оптически светлым вследствие слабой отчетливости отдельных отростков.

Наружные сегменты фоторецепторов имели цилиндрическую форму и состояли из множества сдвоенных мембран, которые формировали накладывающиеся друг

⁴ Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. М.: Мир, 1975:324.

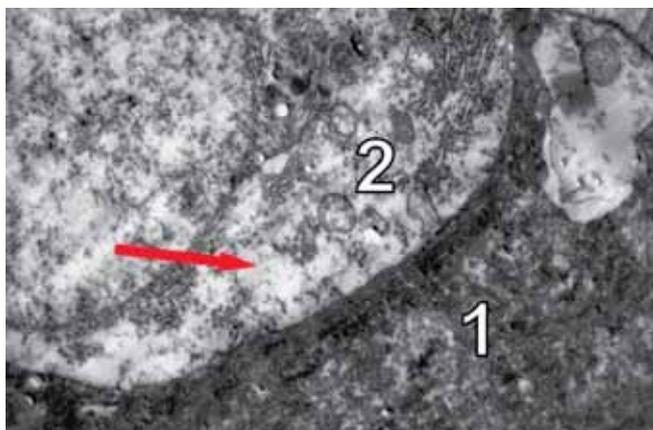


Рис. 1. Ультраструктура сетчатки кролика через 5 дней после витрэктомии с использованием комбинированного красителя MembraneBlue-Dual: 1 — отростки мюллеровых глиоцитов; 2 — ганглиозный нейрон. (↑) — опустошенная часть цитоплазмы. Электронная микрофотография. Увел. ×6000

Fig. 1. Ultrastructure of rabbit retina in 5 days after vitrectomy with using of combined dye Membrane Blue-Dual: 1 — processes of Muller's gliocytes; 2 — ganglion neuron. (↑) — devastated part of cytoplasm. Electron microphotography. ×6000 magnification

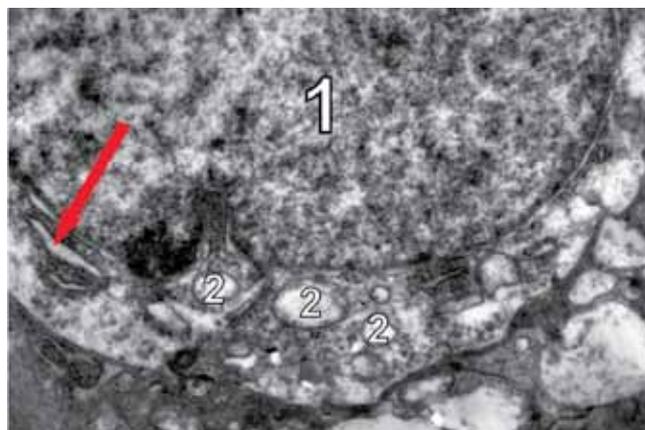


Рис. 2. Ультраструктура сетчатки кролика через 5 дней после витрэктомии с использованием комбинированного красителя «Раствор окрашивающий для офтальмологической хирургии»: 1 — ядро ганглиозного нейрона; 2 — вакуолизация митохондрий в цитоплазме. (↑) — расширение каналов гранулярного эндоплазматического ретикулума. Электронная микрофотография. Увел. ×6000

Fig. 2. Ultrastructure of rabbit retina in 5 days after vitrectomy with using of combined dye "Staining solution for ophthalmic surgery": 1 — nucleus of ganglion neuron; 2 — vacuolation of mitochondria in the cytoplasm. (↑) — expansion of the channels of the granular endoplasmic reticulum. Electron microphotography. ×6000 magnification

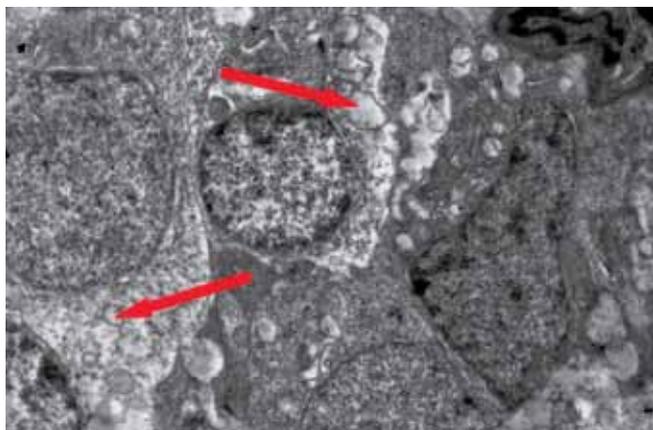


Рис. 3. Ультраструктура сетчатки кролика через 5 дней после витрэктомии с использованием комбинированного красителя MembraneBlue-Dual. (↑) — вакуолизация цитоплазмы нейронов внутреннего ядерного слоя. Электронная микрофотография. Увел. ×3000

Fig. 3. Ultrastructure of rabbit retina in 5 days after vitrectomy with using of combined dye Membrane Blue-Dual. (↑) — vacuolation of the cytoplasm of neurons of the inner nuclear layer. Electron microphotography. ×3000 magnification

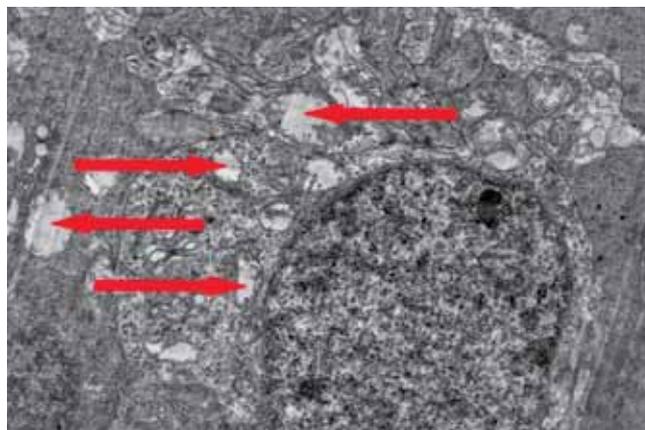


Рис. 4. Ультраструктура сетчатки кролика через 5 дней после витрэктомии с использованием комбинированного красителя «Раствор окрашивающий для офтальмологической хирургии». (↑) — вакуолизация цитоплазмы нейронов внутреннего ядерного слоя. Электронная микрофотография. Увел. ×5000

Fig. 4. Ultrastructure of rabbit retina in 5 days after vitrectomy with using of combined dye «Staining solution for ophthalmic surgery». (↑) — vacuolation of the cytoplasm of neurons of the inner nuclear layer. Electron microphotography. ×5000 magnification

на друга диски. Цитоплазма клеток пигментного эпителия сетчатки была несколько уплотненной. Мембрана Бруха имела интактную ультраструктуру.

Кроме того, во внутреннем ядерном слое местами выявлялись признаки гидропической дистрофии в виде вакуолизации цитоплазмы отдельных нейронов (рис. 3, 4). На образцах с красителем MembraneBlue-Dual в некоторых нейронах часть органелл подвергалась более вы-

раженной деструкции, и цитоплазма в этих зонах казалась полностью опустошенной.

Многочисленные фоторецепторные нейроны в наружном ядерном слое сетчатки имели обычное строение и лежали плотными рядами в обеих группах исследуемого материала. Цитоплазма содержала редкие органеллы и светлым тонким ободком окружала округлые темные ядра. Внутренние сегменты фоторецепторных нейронов

содержали большое количество удлинненных митохондрий с тонкими кристами.

Через 14 дней после хромовитрэктомии с использованием красителя MembraneBlue-Dual в сетчатке кроликов на ультраструктурном уровне признаки отека в отдельных слоях были более выраженными, чем на предыдущие сутки, в отличие от образцов с красителем «Раствор окрашивающий для офтальмологической хи-

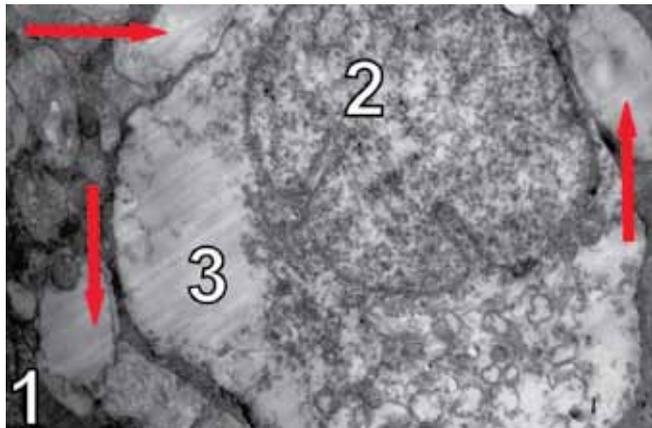


Рис. 5. Ультраструктура сетчатки кролика через 14 дней после витрэктомии с использованием комбинированного красителя MembraneBlue-Dual: 1— отростки мюллеровых глиоцитов; 2 — ганглиозный нейрон; 3 — опустошенная часть цитоплазмы; (↑) — вакуоли. Электронная микрофотография. Увел. $\times 3000$

Fig. 5. Ultrastructure of rabbit retina in 14 days after vitrectomy with using of combined dye Membrane Blue-Dual: 1 — processes of Muller's gliocytes; 2 — ganglion neuron; 3 — devastated part of the cytoplasm; (↑) — vacuole. Electron microphotography, $\times 3000$ magnification

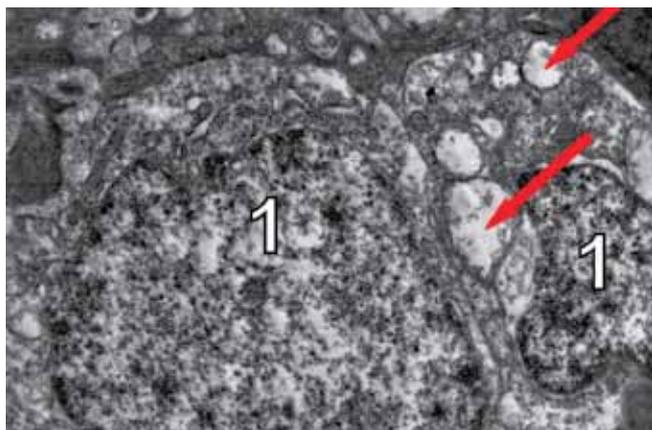


Рис. 7. Ультраструктура сетчатки кролика через 30 дней после витрэктомии с использованием комбинированного красителя MembraneBlue-Dual: 1 — нейроны внутреннего ядерного слоя; (↑) — вакуоли в цитоплазме нейрона. Электронная микрофотография. Увел. $\times 4000$

Fig. 7. Ultrastructure of rabbit retina in 30 days after vitrectomy with using of combined dye Membrane Blue-Dual: 1 — neurons of internal nuclear layer; (↑) — vacuoles in the cytoplasm of neurons. Electron microphotography. $\times 4000$ magnification

рургии», в которых ультраструктурные изменения были примерно такие же, как на предыдущем сроке эксперимента (рис. 5, 6).

Внутренний сетчатый слой в обеих группах имел признаки отека клеточных отростков. Наружный сетчатый слой был нешироким, синапсы в нем определялись редко. В 1-й группе на ультраструктурном уровне хорошо определялись признаки отека слоя фоторецеп-

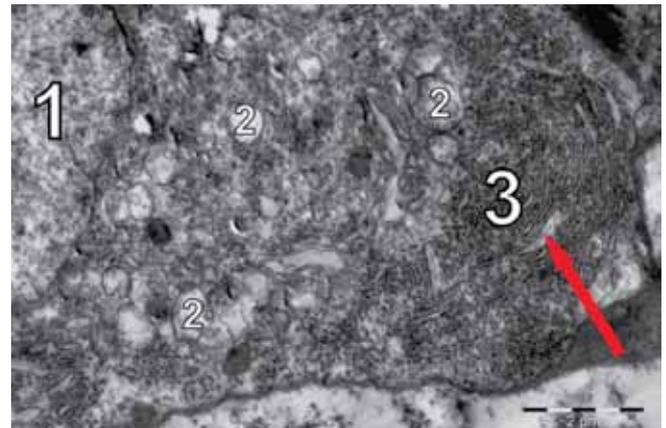


Рис. 6. Ультраструктура сетчатки кролика через 14 дней после витрэктомии с использованием комбинированного красителя «Раствор окрашивающий для офтальмологической хирургии»: 1 — ядро ганглиозного нейрона; 2 — вакуолизация митохондрий в цитоплазме; 3 — тельца Ниссля; (↑) — расширение отдельных каналов гранулированного эндоплазматического ретикулума. Электронная микрофотография. Увел. $\times 6000$

Fig. 6. Ultrastructure of rabbit retina in 14 days after vitrectomy with using of combined dye "Staining solution for ophthalmic surgery": 1 — nucleus of the ganglion neuron; 2 — vacuolization of mitochondria in the cytoplasm; 3 — Nissl bodies; (↑) — expansion of single channels of granular endoplasmic reticulum. Electron microphotography, $\times 6000$ magnification

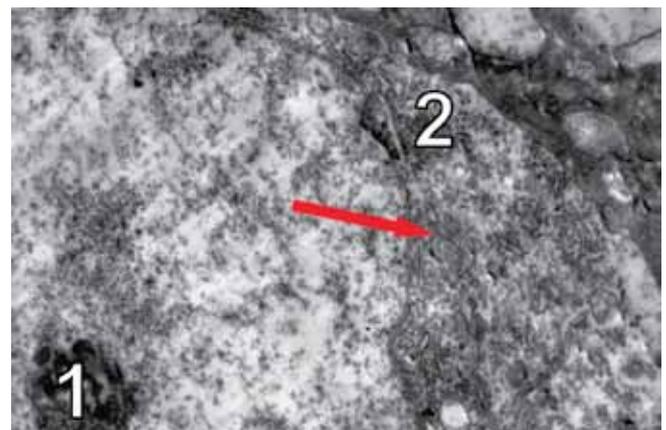


Рис. 8. Ультраструктура сетчатки кролика через 30 дней после витрэктомии с использованием комбинированного красителя «Раствор окрашивающий для офтальмологической хирургии»: 1 — ядрышко в ядре ганглиозного нейрона; 2 — тельца Ниссля; (↑) — пластинчатый комплекс Гольджи. Электронная микрофотография. Увел. $\times 6000$

Fig. 8. Ultrastructure of rabbit retina in 30 days after vitrectomy with using of combined dye "Staining solution for ophthalmic surgery": 1 — nucleolus in the nucleus of the ganglion neuron; 2 — Nissl bodies; (↑) — Golgi complex. Electron microphotography. $\times 6000$ magnification

торных нейронов, во 2-й группе данные изменения не наблюдались.

Через 30 дней после операции в обеих группах в сетчатке кроликов степень выраженности описанных выше патологических изменений уменьшалась. Внутренняя глиальная мембрана имела четкие очертания. Структура сетчатой оболочки была близка к таковой интактных кроликов. Выраженные признаки отека почти во всех слоях сетчатки исчезали. Наружная глиальная мембрана и ножки глиальных элементов под ней выглядели типично для нормы. Ганглиозный слой формировали крупные нейроны с крупными светлыми округлыми ядрами.

Тела мюллеровских глиоцитов между нейронами внутреннего ядерного слоя выглядели интактными. Наружный сетчатый слой сетчатки лишь местами содержал признаки слабого отека отростков нейронов в виде вакуолизации митохондрий. Типичные для сетчатки синапсы в данном слое определялись.

Фоторецепторные нейроны в наружном ядерном слое сетчатки лежали плотными рядами и имели интактную структуру. Во внутренних сегментах фоторецепторных нейронов отечные участки также не определялись.

В цитоплазме ганглиозных клеток выявлялось значительное количество базофильного вещества — телец Ниссля, образованных многочисленными каналами гранулярного эндоплазматического ретикулума и скоплениями рибосом и полисом. Внутренний сетчатый слой сетчатки был слабо отечным. В некоторых нейронах внутреннего ядерного слоя выявлялись вакуолизованные митохондрии, но большая часть нейронов имела типичную для них ультраструктуру (рис. 7, 8). В цитоплазме определялись органеллы без каких-либо изменений.

Наружные сегменты фоторецепторных нейронов состояли из множества двояных мембран, формирующих типичные многочисленные диски, которые охватывались длинными апикальными отростками клеток пигментного эпителия сетчатки, фагоцитируя отработанные диски.

ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам проведенных электронно-микроскопических исследований выявлен стадийный обратимый характер патоморфологических изменений в структурах сетчатки глаз кроликов после экспериментальной хромовитректоми с использованием комбинированных красителей MembraneBlue-Dual и «Раствор окрашивающий для офтальмологической хирургии».

На 5-е сутки эксперимента отмечались умеренно выраженные проявления в виде отека и гидропической дистрофии нейронов. На 14-е сутки установлено отсутствие негативной динамики электронно-микроскопических изменений сетчатки глаза экспериментальных животных. При использовании красителя MembraneBlue-Dual признаки отека в отдельных слоях были более выраженными, в отличие от образцов с красителем «Раствор окрашивающий для офтальмологической хирургии».

В последующем на 30-е сутки наблюдения в обеих группах регистрировали восстановление нормальной ультраструктуры клеточных элементов сетчатки. Это свидетельствует о принципиальной обратимости обнаруженных сдвигов и сравнительно коротком восстановительном периоде после хромовитректоми с использованием комбинированных красителей. Кроме того, не исключено, что выявленные изменения могли возникнуть из-за операционной травмы, которая неизбежно имеет место при выполнении витреоретинальных вмешательств.

Сопоставляя полученные нами данные с исследованиями других авторов, можно отметить следующее.

Комбинированные красители на основе ТВ и ВВГ относятся к новому поколению интравитреальных красителей и обеспечивают достаточно высокую степень окрашивания как ВПМ, так и ЭРМ при минимальной концентрации и объеме [7–9, 14, 21, 22]. Оценки применения тонкослойной хроматографии показали, что объединение ТВ и ВВГ не приводило к совместному красящему эффекту. Красители в комбинации не взаимодействуют химически друг с другом; скорее, каждый краситель окрашивает собственные «таргетные» структуры [23].

Ряд экспериментальных работ по изучению токсического влияния интравитреальных инъекций ВВГ на морфологию и функции сетчатки показали отсутствие токсичности в отношении клеточных структур сетчатки и отсутствие отклонений на электроретинограмме в дозировках 0,01 и 0,1 мг/мл. При более высоких концентрациях (1,0 и 10,0 мг/мл) была зафиксирована вакуолизация клеток ганглиозного слоя и клеток Мюллера [18, 24, 25]. Rodrigues E. и соавт. [26] на глазах кроликов с использованием флюоресцентной ангиографии и гистологии с электронной микроскопией показали безопасность интравитреальных инъекций малых доз (0,05 мл 0,5% и 0,05%) ВВГ. Субретинальные экспериментальные инъекции ВВГ в дозе 0,25 мг/мл также не оказывали токсического влияния на структуры сетчатки [27]. Спектрофотометрические исследования *in vitro* интравитреальных красителей, в том числе и ВВГ, выявили зависимость степени их токсичности от характера и уровня используемого источника эндоиллюминации [28].

Таким образом, полученные нами данные в целом сопоставимы с опубликованными результатами других исследований и могут свидетельствовать о безопасности интравитреального применения комбинированных красителей при условии соблюдения оптимального объема и экспозиции.

ВЫВОДЫ

Комбинированные красители на основе Trypan blue и Brilliant blue G для хромовитректоми имеют высокий профиль безопасности, вызывая незначительные обратимые изменения ультраструктуры сетчатки, наиболее выраженные на 14-е сутки после операции и регрессирующие к 30-м суткам послеоперационного периода.

Выявленные изменения и их характер позволяют предположить наличие их связи с собственно операционной травмой в процессе витрэктомии в большей степени, чем из-за специфического действия компонентов красителей на ретиальные структуры.

УЧАСТИЕ АВТОРОВ

Азнабаев Б. М. — концепция и дизайн исследования;
Янбухтина З. Р. — проведение экспериментов, сбор и анализ данных, написание текста, подготовка иллюстраций, подготовка статьи и ее критический пересмотр в части интеллектуального содержания;
Мухаммадеев Т. Р. — проведение экспериментов;
Дибаяев Т. И. — проведение экспериментов, сбор и анализ данных;
Шакирова Г. Р. — выполнение электронной микроскопии, анализ данных.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Farah M.E., Maia M., Penha F.M., Rodrigues E.B. The Use of Vital Dyes during Vitreoretinal Surgery — Chromovitrectomy. *Dev. Ophthalmol.* 2016;55:365–75. DOI: 10.1159/000438963
- Haritoglou C., Schuttauf F., Gandorfer A., Thaler S. An experimental approach towards novel dyes for intraocular surgery. *Dev. Ophthalmol.* 2008;42:141–152.
- Стебнев В.С., Малов В.М. Микроинвазивная хромовитрэктомия 25+ Gauge в лечении пациентов с идиопатическими макулярными отверстиями. *Саратовский научно-медицинский журнал.* 2013;9(1):98–100. [Stebnev V.S., Malov V.M. Micro-invasive chromovitrectomy 25+ Gauge in the treatment of patients with idiopathic macular holes. *Saratov Journal of Medical Scientific Research=Saratovskii nauchno-meditsinskii zhurnal.* 2013;9(1):98–100. (in Russ)]
- Стебнев С.Д., Стебнев В.С., Малов В.М. Хромовитрэктомия симптоматической витреомacularной адгезии, осложненной первичным полным макулярным отверстием на ранних стадиях его формирования. *Вестник Оренбургского государственного университета.* 2015;12(187):227–230. [Stebnev S.D., Stebnev V.S., Malov V.M. Chromovitrectomy of symptomatic vitreomacular adhesion, complicated by the primary full macular opening in the early stages of its formation. *Annals of Orenburg State University=Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta.* 2015;12(187):227–230. (in Russ)]
- Hernández F., Alpizar-Alvarez N., Wu L. Chromovitrectomy: an Update. *J. Ophthalmic Vis. Res.* 2014;9(2):251–259.
- Saffar M., Ashish S., Javier C., Leandro C., Ajayaprakash P., Navin G., Astrid L., Baruch D., Effects of light on retinal pigment epithelial cells, neurosensory retinal cells, and Müller cells treated with Brilliant Blue G. *Clinical and Experimental Ophthalmology.* 2015;43:820–829. DOI: 10.1111/ceo.12568
- Veckeneer M., Mohr A., Alharthi E., et al. Novel 'heavy' dyes for retinal membrane staining during macular surgery: multicenter clinical assessment. *Acta Ophthalmol.* 2014;92(4): 339–344. DOI: 10.1111/aos.12208
- Mohr A., Bruinsma M., Oellerich S., et al. International Chromovitrectomy Collaboration. Dyes for eyes: hydrodynamics, biocompatibility and efficacy of 'heavy' (dual) dyes for chromovitrectomy. *Ophthalmologica.* 2013;230(2):51–58. DOI: 10.1159/000353870
- Timothy L. Jackson. Vitreoretinal Staining Solutions Part two of a three-part series in which surgeons share pointers on the optimal use of vital dyes in retina surgery. *Retina today.* 2015;37–38.
- Macky T.A., Helmy D., Shazly N. Retinal toxicity of triamcinolone's vehicle (benzyl alcohol): an electrophysiological and electron microscopic study. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2007;245(6):817–824. DOI: 10.1007/s00417-006-0459-3
- Jin Y., Uchida S., Yanagi Y., Aihara M. and Araie M. Neurotoxic effects of trypan blue on rat retinal ganglion cells. *Experimental Eye Research.* 2005;81(4):395–400. DOI: 10.1016/j.exer.2005.02.010
- Kodjikian L., Richter T., Halberstadt M., et al. Toxic effects of indocyanine green, infracyanine green, and trypan blue on the human retinal pigmented epithelium. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology.* 2005;243(9):917–925. DOI: 10.1007/s00417-004-1121-6
- Narayanan R., Kenney M.C., Kamjoo S., Trinh T.H., Seigel G.M., Resende G.P., Kuppermann B.D. Trypan blue: effect on retinal pigment epithelial and neurosensory retinal cells. *Invest Ophthalmol Vis. Sci.* 2005;46:304–309. DOI: 10.1167/iovs.04-0703
- Enaida H., Hisatomi T., Goto Y., et al. Preclinical investigation of internal limiting membrane staining and peeling using intravitreal brilliant blue G. *Retina.* 2006;26:623–30. DOI: 10.1097/01.iae.0000236470.71443.7c.
- Pelays D. E., Kuhn F., Folgar A. M., et al. Staining of the internal limiting membrane with the use of heavy brilliant blue G. *Ophthalmic Research.* 2012;48(1):21–25. DOI: 10.1159/000339845
- Shimada H., Nakashizuka H., Hattori T., Mori R., Mizutani Y., and Yuzawa M. Double staining with brilliant blue G and double peeling for epiretinal membranes. *Ophthalmology.* 2009;116(7):1370–1376. DOI: 10.1016/j.ophtha.2009.01.024
- Cervera E., Driaz-Llopis M., Salom D., Udaondo P., and Amselem L. Internal limiting membrane staining using intravitreal brilliant blue G: good help for vitreoretinal surgeon in training. *Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia.* 2007;82(2):7 1–72.
- Remy M., Thaler S., Schumann R.G., et al. An in vivo evaluation of Brilliant Blue G in animals and humans. *British Journal of Ophthalmology.* 2008;92(8):1142–1147. DOI: 10.1136/bjo.2008.138164
- Velez G., Weingarden A.R., Tucker B.A., Lei H., Kazlauskas A., and Young M.J. Retinal pigment epithelium and muller progenitor cell interaction increase muller progenitor cell expression of PDGFR and ability to induce proliferative vitreoretinopathy in a rabbit model. *Stem. Cells International.* 2012;6. DOI: 10.1155.2012.106486
- Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захариха Е.А. Лабораторные животные их разведение, содержание и использование в эксперименте. Киев.1984;56. [Zapadnjuk I.P., Zapadnjuk V.I., Zaharija E.A. Laboratory animals, their breeding, content and use in the experiment. Kiev. 1984;56. (in Russ)].
- Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. of Cell Biology.* 1963;17:208–212.
- Enaida H., Hisatomi T., Hata Y., et al. Brilliant blue G selectively stains the internal limiting membrane/ brilliant blue G-assisted membrane peeling. *Retina.* 2006;26:631–6. DOI: 10.1097/01.iae.0000236469.71443
- Hiebl W., Günther B., Meinert H. Substances for staining biological tissues: use of dyes in ophthalmology. *Klin. Monbl. Augenheilkd.* 2005;222(4):309–11. DOI: 10.1055/s-2005-858030
- Andreas M. Mohr, Vitreoretinal Staining Solutions Part three of a three-part series in which surgeons share pointers on the optimal use of vital dyes in retina surgery. *Retina Today.* 2015;85–86.
- Farah M.E., Maia M., Rodrigues E.B. Dyes in ocular surgery: principles for use in chromovitrectomy. *Am. J. Ophthalmol.* 2009;148:332–340. DOI:10.1016/j.ajo.2009.04.003.
- Haritoglou C., Gandorfer A., Schaumberger M., et al. Trypan blue in macular pucker surgery: an evaluation of histology and functional outcome. *Retina.* 2004;24(4):582–590.
- Hiroshi E., Toshio H., Yasuaki H., Akifumi U., Tatsuhiro I. Brilliant blue G selectively stains the internal limiting membrane/brilliant blue G-assisted membrane peeling. *Retina.* 2006;26: 631–636. DOI: 10.1097/01.iae.0000236469.71443
- Costa E.F., Rodrigues E.B., Penha F.M., et al. The use of vital dyes in ocular surgery. *Surv. Ophthalmol.* 2009;54:576–617. DOI/10.1016/j.survophthal.2009.04.011

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министрства здравоохранения РФ
 ЗАО «Оптимедсервис»
 Азнабаев Булат Маратович
 доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой, Генеральный директор ЗАО «Оптимедсервис»
 ул. Ленина, 3, Уфа, 450008, Республика Башкортостан
 ул. 50 лет СССР, 8, Уфа, 450059, Республика Башкортостан

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министрства здравоохранения РФ
 ЗАО «Оптимедсервис»
 * Янбухтина Зилия Раилевна
 ассистент кафедры, заместитель Генерального директора ЗАО «Оптимедсервис»
 ул. Ленина, 3, Уфа, 450008, Республика Башкортостан
 ул. 50 лет СССР, 8, Уфа, 450059, Республика Башкортостан

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министрства здравоохранения РФ
 ЗАО «Оптимедсервис»
 Мухамадеев Тимур Рафаэльевич, доктор медицинских наук, доцент кафедры, заместитель Генерального директора по научно-клинической работе
 ул. Ленина, 3, Уфа, 450008, Республика Башкортостан
 ул. 50 лет СССР, 8, Уфа, 450059, Республика Башкортостан

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министрства здравоохранения РФ
 ЗАО «Оптимедсервис»
 Дибаяев Тагир Ильдарович
 кандидат медицинских наук, ассистент кафедры, руководитель научной группы
 ул. Ленина, 3, Уфа, 450008, Республика Башкортостан
 ул. 50 лет СССР, 8, Уфа, 450059, Республика Башкортостан

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина»
 Шакирова Галия Рафатовна
 доктор биологических наук, профессор
 ул. Академика Скрябина, 23, Москва, 109472, Российская Федерация

ABOUT THE AUTHORS

Bashkir State Medical University, Department of JSC “Optimedservis”
 Aznabaev Bulat M.
 MD, PhD, professor, head of department, general director of JSC “Optimedservis”
 Lenina str., 3, Ufa, 450008, Republic of Bashkortostan, Russia
 50 let SSSR str., 8, Ufa, 450059, Republic of Bashkortostan, Russia

Bashkir State Medical University, Department of JSC “Optimedservis”
 * Yanbukhtina Zilya R.
 MD, assistant, deputy general director of JSC “Optimedservis”
 Lenina str., 3, Ufa, 450008, Republic of Bashkortostan, Russia
 50 let SSSR str., 8, Ufa, 450059, Republic of Bashkortostan, Russia

Bashkir State Medical University, Department of JSC “Optimedservis”
 Mukhamadeev Timur R.
 MD, PhD, associate professor, deputy general director of JSC “Optimedservis”
 Lenina str., 3, Ufa, 450008, Republic of Bashkortostan, Russia
 50 let SSSR str., 8, Ufa, 450059, Republic of Bashkortostan, Russia

Bashkir State Medical University, Department of JSC “Optimedservis”
 Dibaev Tagir I.
 MD, PhD, Assistant, head of scientific group
 Lenina str., 3, Ufa, 450008, Republic of Bashkortostan, Russia
 50 let SSSR str., 8, Ufa, 450059, Republic of Bashkortostan, Russia

Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MBA named after K.I. Scriabin
 Shakirova Galiya R.
 PhD, professor
 Akademika Skryabina str., Moscow, 109472, Russia