

2. Drance S.M., Airaksinen P.J.: *Signs of Early Damage in Open-Angle Glaucoma*. ed. Weinstein G.W. Churchill Livingstone, N.Y., Edinburgh, London, Melbourne, 1986, 17-29.
3. Fukuchi T., Sawaguchi S., Hara H., Shirakashi M., Iwata K.: *Extracellular matrix changes of the optic nerve lamina cribrosa in monkey eyes with experimentally chronic glaucoma*. Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., 1992, 230, 421-427.
4. Gonzalez-Avila G., Ginebra M., Hayakawa T., Vadillo-Ortega F., Teran L., Selman M.: *Collagen metabolism in human aqueous humor from primary open-angle glaucoma. Decreased degradation and increased biosynthesis play a role in its pathogenesis*. Arch. Ophthalmol., 1995, 113, 1319-1323.
5. Hernandez M.R., Ye E.: *Glaucoma: changes in extracellular matrix in the optic nerve head*. Ann. Mad., 1993, 25, 309-315.
6. Iwata K.: *Primary open angle glaucoma and low tension glaucoma – pathogenesis and mechanism of optic nerve damage*. Nippon Ganka Gakkai Zasshi., 1992, 96, 1501-1531.
7. Jensen L.T., Jorgensen J.O.: *Type I and III procollagen propeptides in growth hormone-deficient patients*. Acta Endocrinol., 1991, 124, 278-282.
8. Keeley F.W., Morin J.D., Vesely S.: *Characterization of collagen from normal human sclera*. Exp. Eye Res., 1984, 39, 533-542.
9. Kucharz E.J.: *Collagens: Biochemistry and Pathophysiology*. Springer-Verlag, Berlin, Hailderberg, New York, 1992.
10. Konomi H., Hayashi T., Sano J., Terato K., Nagai Y., Arima M., Nakayashu K., Tanaka M., Nakajima A.: *Immunohistochemical localization of type I, III and IV collagens in the sclera and choroid of bovine, rat and normal and pathological human eyes*. Biomed. Res., 1983, 4, 451-458.
11. Morrison J., Farrell S., Johnson E., Deppmeier L., Moore C.G., Grossmann E.: *Structure and composition of the rodent lamina cribrosa*. Exp. Eye Res., 1995, 60, 127-135.
12. Puistola U., Risteli L.: *Markers of type I and III collagen synthesis in serum as indications of tissue growth during pregnancy*. J. Clin. Endocrinol. Metab., 1993, 77, 178-181.
13. Quigley H.A., Dorman-Pease M.E., Brown A.E.: *Quantitative study of collagen and elastin of the optic nerve head and sclera in human and experimental monkey glaucoma*. Curr. Eye Res., 1991, 10, 877-888.
14. Rodrigues M., Katz S., Foidart J.M., Spaeth G.: *Collagen, factor VIII antigen and immunoglobulin in the human chainage channels*. Ophthalmology, 1980, 87, 337-345.
15. Schmut O.: *The identification of type III collagen in calf and bovine cornea and sclera*. Exp. Eye Res., 1977, 25, 505.
16. Stocker S., Grumaug J.A., Druguet M., Bernard M., Durand L.: *Collagene trabeculaire comeosclera*. J. Fr. Ophthalmol., 1980, 6-7, 415-422.
17. Tengroth B., Rehnberg M., Amitzbohl T.: *A comparative analysis of the collagen type and distribution in the trabecular meshwork, sclera, lamina cribrosa and optic nerve in the human eye*. Acta Ophthalmol., 1985, 63 suppl., 173, 91-93.
18. Thale A., Tillman B.: *The collagen architecture of the sclera-SEM and immunohistochemical studies*. Anat. Anz., 1993, 175, 215-220.
19. Yang J.L., Neufeld A.H., Zorn M.B., Hernandez M.R.: *Collagen type I mRNA levels in cultured human lamina cribrosa cells: effects of elevated hydrostatic pressure*. Exp. Eye Res., 1993, 56, 567-574.

Praca wpłynęła do Redakcji 9 stycznia 1997 r. (514)

Prace oryginalne

Klinika Oczna 1997, 99 (1): 15-19
ISSN 0023-2157 Indeks 362 646

Obraz ultrastrukturalny skaningowy (SEM) płynu podsiatkówkowego w samoistnym odwarstwieniu siatkówki SRF ultrastructural scanning electron microscopic study in idiopathic retinal detachment

Alina Bakunowicz-Łazarczyk, Stanisław Sulkowski¹, Andrzej Stankiewicz

Purpose: To evaluate the cells of subretinal fluid (SRF) by the use of the scanning electron microscope and to determine relationships between morfologic features of SRF and duration of retinal detachment.

Materials and methods: Subretinal fluid was taken from 7 patients with retinal detachment. The cytologic preparations were analyzed in electron scanning microscope (IEOL).

Results: The highest count of cells (predominantly macrophages and lymphocytes) were seen in SRF obtained in the third week after retinal detachment. Retinal detachment, which lasted more than 3 weeks, caused lower SRF cells count and changes in cells composition. After 6 months normal cells were not present in SRF.

Słowa kluczowe: płyn podsiatkówkowy, morfologia, SEM

Key words: subretinal fluid, morfology, SEM

Badania morfologiczne płynu podsiatkówkowego (SRF) w mikroskopie świetlnym wykazały obecność komórek pochodzących z części nerwowej siatkówki, z nabłonka barwnikowego oraz z krwi (4).

Celem niniejszej pracy była ocena komórek płynu podsiatkówkowego w mikroskopie elektronowym skaningowym (SEM) oraz próba powiązania zmian w obrazie SRF z czasem trwania odwarstwienia siatkówki.

Materiał i metodyka

Do badań użyto po 0,5 ml czystego SRF od 7 chorych (3 kobiet i 4 mężczyzn) w wieku od 40 do 60 lat, operowanych w Klinice Okulistycznej AMB w 1993 roku.

U 1 osoby stwierdzono wysoką krótkowzroczność. Czas trwania odwarstwienia u 2 osób wynosił około 3 tygodni, u 1 chorego 8 tygodni, zaś u 2 – około 6 miesięcy.

Przed operacją u 4 osób ostrość wzroku była ograniczona do poczucia światła, u 2 wynosiła 2/50, a u 1 chorego 5/12.

U 4 osób odwarstwienie siatkówki obejmowało 2 kwadranty, u 3 chorych natomiast 4 kwadranty. U 5 osób stwierdzono otwory pojedyncze: u 4 osób u góry i u 1 pacjenta w części dolnej dna oka. U 1 chorego zlokalizowano 3 otwory w części górnej odwarstwionej siatkówki, zaś u 1 osoby otworu nie udało się znaleźć.

U 5 osób stwierdzono zwyrodnienie drobnotębiowate obwodu siatkówki, a u 1 chorego zaniki siatkówkowo-naczyniówkowe.

U 2 osób w oku z odwarstwieniem występowały zmiany proliferacyjne szklistkowo-siatkówkowe (PVR) stopnia A, u 3 stopnia B, u 2 chorych zaś stopnia C₁.

Z każdej porcji płynu podsiatkówkowego wykonywano po 10 minutach od pobrania 4 preparaty osadowe, stosując techniki opisane uprzednio, oraz typowe preparaty cytologiczne, stosując technikę rozmazu (2). Te ostatnie barwiono hematoksyliną i eozyną (HE) oraz metodą MGG i analizowano w mikroskopie świetlnym.

¹ Z Katedry Okulistycznej AM w Białymstoku
Kierownik: prof. dr hab. Andrzej Stankiewicz

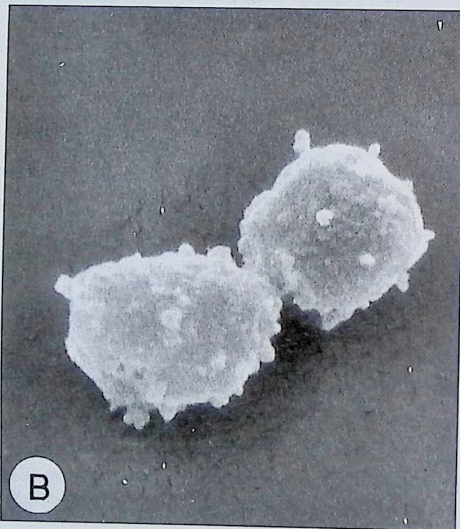
² Z Zakładu Anatomii Patologicznej AM w Białymstoku
Kierownik: prof. dr hab. Henryk Nowak

Praca wygłoszona w czasie XXXVIII Zjazdu Okulistów Polskich w Mikołajkach, 31.05-3.06.1995 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
Dr hab. med. Alina Bakunowicz-Łazarczyk
Klinika Okulistyki Dziecięcej
Dziecięcy Szpital Kliniczny
ul. Waszyngłona 17
15-274 Białystok

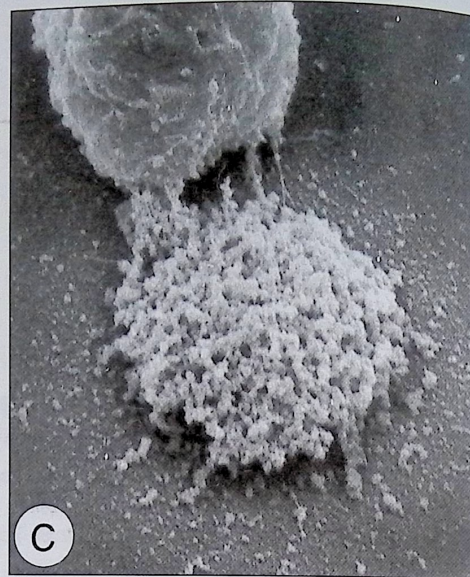


Ryc. 1A. Makrofag o silnie rozbudowanej błonie cytoplazmatycznej z licznymi blaszkowatymi wypustkami i bąbelkowatymi uwypukleniami. Komórka wytwarza w kierunku podłoża długie filopodia i szerokie, welonowate pseudopodia
 Fig. 1A. Macrophage with highly enlarged cytoplasmatic membrane with numerous laminar processes and blister bulges. The cell forms long phylopodies and vast veil-like pseudopodies in the direction of the base

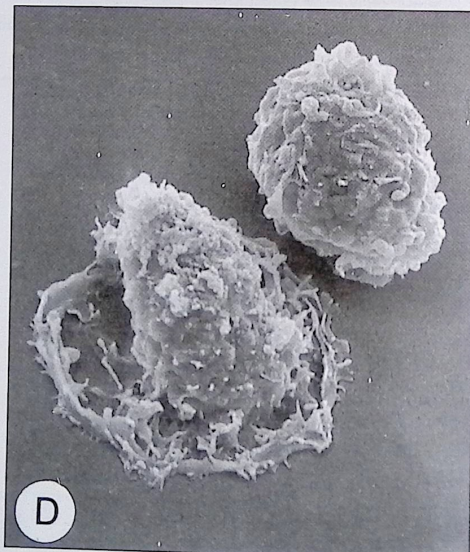


Ryc. 1B. Stosunkowo słabo rozbudowana błona cytoplazmatyczna tworząca krótkie wypustki – obserwowana u komórek wielkością odpowiadających limfocytom
 Fig. 1B. Relatively poorly enlarged cytoplasmatic membrane forming short processes observed in cells of the size of lymphocytes

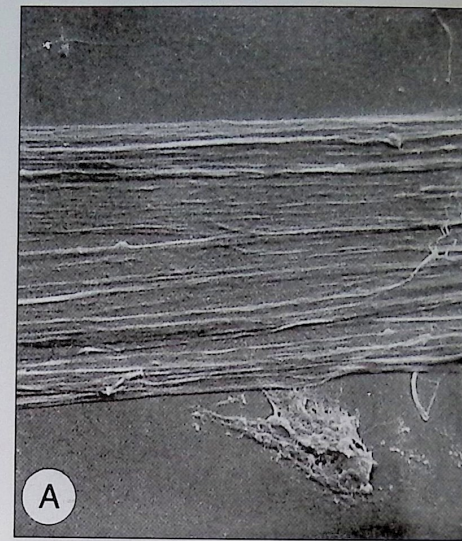
Ryc. 1A-1D. SRF – po trzech tygodniach trwania odwarstwienia SEM. Pow. A – 6000x, B – 8000x, C – 5000x, D – 3000x
 Fig. 1A-1D. SRF – after 3 weeks of retinal detachment. SEM. Magn. A – 6000x, B – 8000x, C – 5000x, D – 3000x



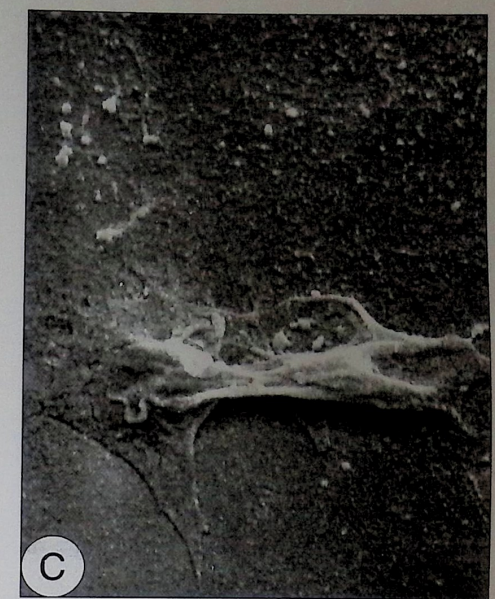
Ryc. 1C. W pobliżu komórki o wygładzonej powierzchni widoczna jest komórka o silnie rozbudowanej powierzchni w postaci liczych, drobnych pęcherzyków odpowiadająca degranulującemu mastocytowi
 Fig. 1C. Nearby the cell with smoothed surface there is a cell the surface of which is highly enlarged with numerous tiny vesicles corresponding to degranulating mastocyte



Ryc. 1D. Brylowate komórki o nieregularnych kształtach i dość dobrze rozbudowanej błonie cytoplazmatycznej, jedna z nich wytwarza nieregularny welon wokół podstawy. Obraz morfologiczny nie jest w pełni charakterystyczny dla makrofagów, chociaż komórki te posiadają zbliżoną wielkość
 Fig. 1D. Massive cells of irregular shapes and quite well enlarged cytoplasmatic membranes; one of them forms irregular veil around the base. Morphologic picture is not fully characteristic for macrophages, although those cells have similar size



Ryc. 2A. W pobliżu pasma materiału o charakterze śluzu uszkodzona, rozpadająca się komórka
 Fig. 2A. Damaged, disintegrating cell near the material band with features of mucus



Ryc. 2B-2D. Wydłużone, rozplaszczające się komórki wykazują morfologiczne podobieństwo do fibroblastów.
 Fig. 2B-2D. Elongated flattening cells show morphologic similarity to fibroblasts.

Ryc. 2A-2D. SRF – po 8 tygodniach trwania odwarstwienia. SEM. Pow. A – 3000x, B – 8000x, C i D – 5000x
 Fig. 2A-2D. SRF – after 8 weeks of detachment. SEM. Magn. A – 3000x, B – 8000x, C and D – 5000x

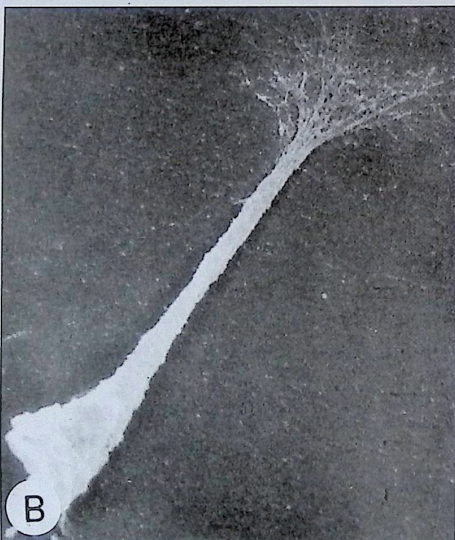
Cztery preparaty wykonane techniką osadową inkubowano natomiast w cieplarni w temp. +37°C przez 30 min, a następnie utrwalało w 1% aldehydzie glutarowym. Po dotrwaleniu w 0,1% OsO₄ i wysuszeniu w punkcie krytycznym CO₂, napyłano węglem i złotem. Analizę komórek przeprowadzano w mikroskopie elektronowym skaningowym firmy JEOL przy napięciu 10 kV.

Wyniki

Prowadząc analizę ultrastrukturalną komórek w SEM w celu obiektywizacji wyników, dokonywano jednoczesnej oceny preparatów cytologicznych barwionych metodami HE i MGG. Wyniki tej analizy jako pomocnicze nie zostały szerzej omówione w niniejszej pracy.



Ryc. 3A. Silnie rozplaszczony granulocyt z uwidaczniającym się charakterystycznym wielopłatkowym jądrem
Fig. 3A. Highly flattened granulocyte with visualized characteristic multilobar nucleus

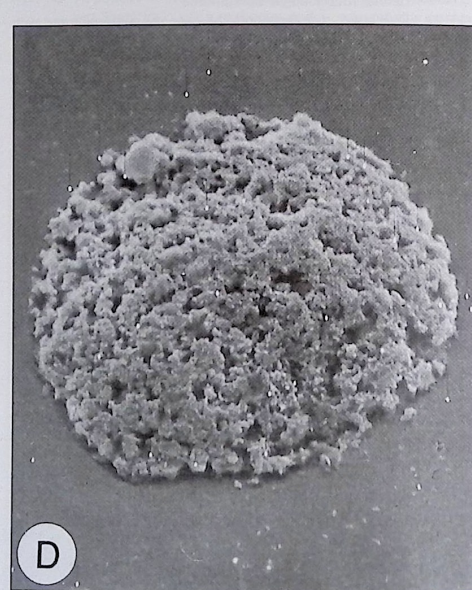
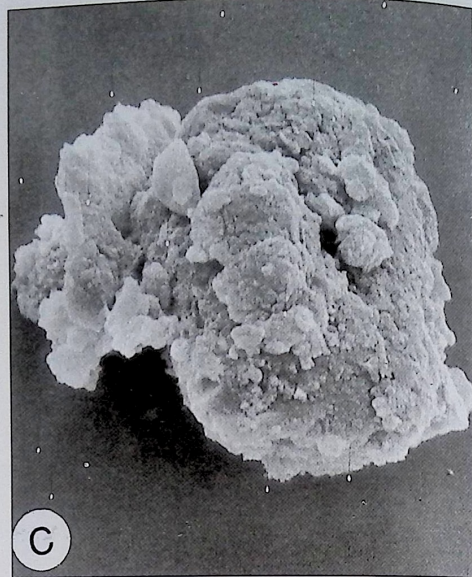


Ryc. 3B. Komórka pochodząca najprawdopodobniej z nerwowej części siatkówki
Fig. 3B. Cell presumably derived from the nerve part of retina

Ryc. 3A-3D. SRF – A, B, C – po 10 tygodniach, D – po 6 miesiącach trwania odwarstwienia.
SEM. Pow. A i B – 3000x, C – 4000x, D – 2000x

Fig. 3A-3D. SRF – A, B, C – after 10 weeks, D – after 6 months of detachment. SEM. Magn. A and B – 3000x, C – 4000x, D – 2000x

U chorych z trzytygodniowym odwarstwieniem siatkówki stwierdzono bogatą komórkową SRF. W obrazie ultrastrukturalnym w SEM najliczniej występowały komórki o silnie rozbudowanej błonie komórkowej, tworzącej liczne filopodia oraz szersze welonowate pseudopodia, którymi przytwierdzały się one do podłoża (ryc. 1A). Komórki te identyfikowano jako makrofagi. Rzadziej obserwowano inne rodzaje komórek, wśród których wyróżniono: limfocyty (ryc. 1B), ulegające degradacji mastocyty (ryc. 1C) oraz komórki mogące



Ryc. 3C-3D. Uszkodzone, rozpadające się, trudne do precyzyjnej identyfikacji komórki

Fig. 3C-3D. Damaged, disintegrating cells, difficult to identify precisely

dopodia, którymi przytwierdzały się one do podłoża (ryc. 1A). Komórki te identyfikowano jako makrofagi. Rzadziej obserwowano inne rodzaje komórek, wśród których wyróżniono: limfocyty (ryc. 1B), ulegające degradacji mastocyty (ryc. 1C) oraz komórki mogące

pochodzić z nabłonka barwnikowego ulegające transformacji w kierunku komórek o morfologicznych cechach makrofaga (ryc. 1D). Zwłaszcza ta ostatnia populacja była silnie zróżnicowana pod względem obrazu morfologicznego. Wyodrębnione w tej grupie komórki posiadały nieregularne kształty, często zbliżone do stożka, jednak ich wielkość i obraz powierzchni błony komórkowej były zbliżone do populacji makrofagów.

W ośmiotygodniowym SRF stwierdzono obecność materiału śluzowego (ryc. 2A) i komórek zbliżonych morfologicznie do fibroblastów (ryc. 2B-2D). Z populacji komórek obserwowanych wcześniej (trzytygodniowy SRF) najczęściej spotykano makrofagi, przy czym posiadały one słabiej rozbudowaną błonę cytoplazmatyczną i rzadko wytwarzały filopodia w kierunku podłoża. Spotykano również komórki wykazujące morfologiczne wykładniki uszkodzenia oraz komórki rozpadające się (ryc. 2A). Dwie ostatnie grupy komórek były znacznie częściej obserwowane w dziesięciodniowym SRF (ryc. 3D), a po sześciu miesiącach stanowiły jedyną obserwowaną populację (ryc. 3D). Ponadto u 1 chorego po dziesięciu tygodniach trwania odwarstwienia obserwowano nieliczne neutrofile (ryc. 3A), u drugiego (z tym samym czasem odwarstwienia) zaś komórki pochodzące prawdopodobnie z części nerwowej siatkówki (ryc. 3B).

Omówienie

Przeprowadzone badania są zgodne z obserwacjami Manna (8), który podaje, że w odwarstwieniu siatkówki trwającym ponad kilka miesięcy brak jest prawidłowych elementów morfologicznych, spotyka się natomiast cienie komórkowe. Przedmiotem dyskusji pozostaje pytanie, na ile obserwowane zmiany w składzie komórkowym i w obrazie morfologicznym komórek są specyficzne dla poszczególnych okresów trwania odwarstwienia siatkówki. Laszczyk (7) nie stwierdziła swoistości obrazu cytologicznego w przypadkach odwarstwień samoistnych. W naszych badaniach natomiast zaznaczyła się pewna etapowość zmian obserwowanych zarówno w składzie, jak i morfologii komórek. Największą różnorodność morfologiczną wykazywał SRF pochodzący z krótkotrwałego odwarstwienia. Szczególnie istotną wydaje się obecność w powyższym przedziale czasowym limfocytów i makrofagów o silnie rozbudowanej błonie cytoplazmatycznej, co jest morfologicznym wykładnikiem aktywacji tego układu komórek. Wprawdzie na obecnym etapie wiedzy trudno jest precyzyjnie powiązać morfologiczne szczegóły powierzchni komórkowej z funkcją komórek, to wiadomo jednak, że makrofagi wykazujące morfologiczne cechy aktywacji produkują w zwiększonych ilościach szereg biologicznie czynnych związków (eg: cytokiny, enzymy lizosomalne, składniki dopełniacza) (9).

W późniejszych przedziałach czasowych obserwowano w SRF spadek liczby makrofagów i limfocytów, dominowały natomiast inne populacje komórkowe. W jednym przypadku PVR stopnia C (czas trwania odwarstwienia 10 tygodni) w SRF występowały fibroblasty i pojedyncze granulocyty, zaś u innej osoby z tym samym stopniem, lecz z dłuższym czasem odwarstwienia (6 miesięcy) obserwowano jedynie rozpadłe komórki.

Nie można wykluczyć, że część komórek o morfologicznych cechach fibroblastów była przekształconymi komórkami nabłonka barwnikowego (ryc. 2D). Na taką możliwość zwracają uwagę Vappu Siren, Eava-Marjatta Salonen i inni (10). U jednego chorego z dziesięciodniowym odwarstwieniem znaleziono komórki pochodzące prawdopodobnie z nerwowej części siatkówki. Pacjent ten miał otwór zlokalizowany w dolnej części obwodu dna oka i posiadał najlepszą ostrość wzroku.

Otwartym zagadnieniem pozostaje fakt możliwości transformacji komórek nabłonka barwnikowego siatkówki i komórki o charakterze makrofagów, chociaż badania Essera i Heimana (3) wydają się wskazywać na istnienie takiej możliwości.

Przeprowadzone obserwacje wykazały, że we wczesnych okresach trwania odwarstwienia cechą charakterystyczną SRF jest obecność napływowych elementów komórkowych, a zwłaszcza makrofagów i limfocytów. Można przypuszczać, że największe nagromadzenie w „świeżym” odwarstwieniu właśnie tych elementów komórkowych jest punktem wyjścia dla różnorodnych procesów immunologicznych o podłożu zapalnym, które stymulują rozwój PVR (1, 5, 6) oraz decydują o kierunku późniejszych zmian.

Piśmiennictwo

- Bonnet M.: *The development of serve proliferative vitreoretinopathy after retinal detachment surgery*. Graefes Arch. Ophthalmol., 1988, 266, 201-205.
- Domagała W, Kohn A.V., Koss L.C.: *A simple method of preparation and identification of cells for scanning electron microscopy*. Acta Cytol., 1979, 23, 140-144.
- Esser P., Heimann K., Wiedemann P.: *Macrophages in proliferative vitreoretinopathy and proliferative diabetic retinopathy: differentiation of subpopulations*. Br. J. Ophthalmol., 1993, 77, 731-734.
- Gierkova A, Niebój T.K.: *Zależność między cytologią, cytochemią, składem białkowym płynu podsiatkówkowego a przebiegiem klinicznym odwarstwień siatkówki*. Klin. Oczna, 1972, 42, 249-253.
- Hackett S.F., Conway B.P., Campochiaro P.A.: *Subretinal fluid stimulation of retinal pigment epithelial cell migration and proliferation is dependent on certain features of the detachment or its treatment*. Arch. Ophthalmol., 1987, 107, 391-396.
- Kirchhof B., Kirchhof E., Rayan S.J., Dixon I.E.P., Barton B.E., Sorgente N.: *Macrophage modulation of retinal pigment epithelial cell migration and proliferation*. Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., 1989, 227, 60-66.
- Laszczyk W.A.: *Próby różnicowania odwarstwień siatkówki na podstawie obrazów cytologicznych płynów podsiatkówkowych*. Klin. Oczna, 1969, 39, 227-230.
- Manna F., Meyer J., Mielnik J.: *Morfologia płynu podsiatkówkowego w samoistnym odwarstwieniu siatkówki*. Klin. Oczna, 1964, 34, 1-5.
- Nathan C.F.: *Secretory products of macrophages*. J. Clin. Invest., 1987, 79, 319-323.
- Siren V., Salonen E.M., Vaheri A., Tommila P., Immonen I.: *Culture of retinal pigment epithelial cells from subretinal fluid*. Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol., 1990, 228, 509-515.

Praca wpłynęła do Redakcji 24 kwietnia 1995 r. (150)