

BIẾN ĐỔI SIÊU CẤU TRÚC GIÁC MẠC THỎ BỊ BỎNG KIỀM KHI CHIẾU LASER HELIUM-NEON

*Nguyễn Khang Sơn**

TÓM TẮT

Nghiên cứu siêu cấu trúc giác mạc thỏ sau bỏng kiềm khu vực được chiếu tại chỗ bằng laser helium - neon (He-Ne) (mật độ công suất 2 mW/cm², hàng ngày), nhận thấy:

- Chất kiềm gây tổn thương cho các tầng mô giác mạc thỏ vùng bị bỏng ở những mức độ khác nhau: làm chết tế bào biểu mô bề mặt, giảm mạnh lượng glycogen trong bào tương tế bào, làm mất cấu trúc liên kết giữa tế bào biểu mô, đồng thời gây thoái hóa các bào quan tế bào và từng vùng mô nền giác mạc.

- Những biểu hiện hồi phục cấu trúc siêu vi thể ở giác mạc thỏ bị bỏng được chiếu laser He-Ne tương tự ở các mức độ bỏng nhưng sớm hơn so với ở giác mạc thỏ bị bỏng không được chiếu laser.

* Từ khóa: Giác mạc; Biến đổi siêu cấu trúc; Bỏng kiềm; Laser He-Ne; Thỏ.

ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN ALKALI-BURNED CORNEA OF RABBIT UNDER HE-NE LASER

SUMMARY

Studying ultrastructure of rabbit cornea burned insitu by alkali solution, then being treated by irradiating He-Ne laser beam (with 2 mW/cm² power density), the authors observed:

- The corneal structures were injured by alkali different degrees: superficial cells were mortal; grave degreasing amounts in glycogen inclusion of the epithelial cells; the disappearance of the structures that participate in cohesion among epithelial cells; the degeneration in cytoplasm of epithelial cells and keratocytes, and in the stroma.

- The reparative regeneration of the rabbit corneal ultrastructure treated by He-Ne laser was similar but more rapid than the control.

* *Key words: Cornea; Ultrastructure changes; Alkali burn; He-Ne laser; Rabbits.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bình thường, ở biểu mô trước giác mạc luôn có sự tái tạo sinh lý để duy trì trạng thái cân bằng về cấu trúc mô. Khi giác mạc bị tổn thương, quá trình lành vết thương diễn biến tùy thuộc vào đặc điểm của tác nhân và mức độ tổn thương. Sự hồi phục biểu mô trước của giác mạc bao gồm 3 hiện tượng riêng biệt và diễn ra liên tiếp, đó là: sự di cư của các tế bào biểu mô quanh

vết thương; tăng sinh tế bào vùng rìa và lớp tế bào đáy biểu mô; sự hồi phục và hình thành những hình thái liên kết giữa tế bào biểu mô với nhau và với chân bì giác mạc qua màng đáy [1]. Ở giác mạc bị bỏng do chất kiềm, quá trình lành vết thương còn phụ thuộc vào sự hồi phục của mô nền và nội mô [2]. Về hình thái học, hiện tượng kể trên không những được nhận thấy ở mức vi thể và hóa mô, mà còn được thể hiện ở mức siêu vi.

* *Đại học Y Hà Nội*

*Phản biện khoa học: PGS. TS. Quân Hoàng Lâm
PGS. TS. Nguyễn Văn Đàm*

Chúng tôi thực hiện nghiên cứu này với mục tiêu: *Đánh giá quá trình lành vết thương ở mức siêu vi của giác mạc thỏ bị bỏng kiềm khu trú, dưới tác động của bức xạ laser He - Ne.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

Thỏ trưởng thành, khỏe mạnh, không mắc bệnh mắt và ngoài da, nặng trung bình 1,8 - 2,2 kg, được nuôi trong cùng điều kiện phòng thí nghiệm.

2. Phương pháp nghiên cứu.

* Gây bỏng mắt thỏ:

Sau khi gây mê thỏ bằng ether, gây bỏng khu vực giác mạc mắt phải bằng cách đặt đĩa giấy thấm đường kính 5 mm, tẩm dung dịch NaOH 3% lên giác mạc thỏ ở vị trí 9 giờ trong 7 giây (theo phương pháp của LD. Omerod [3]). Vết bỏng xuất hiện ngay, có hình tròn đều, đường kính khoảng 5,5 mm, chiếm khoảng 10% diện tích giác mạc, có màu đục kính mờ.

* Máy chiếu laser He-Ne:

Máy laser He-Ne, bước sóng 632,8 nm, chế độ phát liên tục, công suất 2 mW. Hướng chùm tia tiếp tuyến với chiều cong của giác mạc, mật độ công suất 2 mW/cm². Thời gian chiếu tại vết bỏng 3 phút, vùng xung quanh vết bỏng 2 phút. Mỗi ngày chiếu một lần, khoảng 8 - 10 giờ. Chiếu lần đầu sau khi làm thủ thuật gây bỏng 24 giờ.

* Phân nhóm thí nghiệm và ký hiệu:

- Lô 5 ngày: 5 mắt thỏ chứng (C5) và 6 mắt thỏ được chiếu laser (L5).
- Lô 15 ngày: 5 mắt thỏ chứng (C15) và 6 mắt thỏ được chiếu laser (L15).
- Lô 28 ngày: 5 mắt thỏ chứng (C28) và 6 mắt thỏ được chiếu laser (L28).
- Lô bình thường: 5 mắt thỏ bình thường (N).

* Kỹ thuật và chỉ tiêu nghiên cứu:

Giết thỏ vào 7 - 8 giờ sáng, lấy bệnh phẩm:

- Cố định bệnh phẩm trong carnoy, làm tiêu bản mô học, đánh giá biến đổi cấu trúc vi thể để định hướng chọn mẫu hiển vi điện tử.

- Cố định bệnh phẩm trong glutaraldehyt 2,5% và axít osmic 1% khử nước, vùi trong durcupan, cắt lát siêu mỏng (30 - 80 nm), nhuộm uranyl acetate 5% và chì citrate (theo Reynolds). Đọc và chụp ảnh trên kính hiển vi điện tử JEM-1010.

- Những chỉ tiêu nghiên cứu về tổn thương và sự hồi phục giác mạc thỏ:

+ Đánh giá biến đổi siêu cấu trúc tế bào và mối liên kết giữa các tế bào biểu mô trước với nhau và với màng đáy.

+ Đánh giá biến đổi siêu cấu trúc của mô nền chân bì giác mạc.

+ Đánh giá biến đổi siêu cấu trúc màng Descemet và nội mô giác mạc.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Đặc điểm siêu cấu trúc giác mạc thỏ vùng bị bỏng kiềm ở một số thời điểm của quá trình tự hồi phục.

* Sau 5 ngày bị bỏng:

Phát hiện 2 biến đổi hình thái: tổn thương tế bào và giảm liên kết giữa các tế bào. Những biến đổi đó nhẹ dần, từ trước ra sau của giác mạc.

Những tế bào bề mặt của biểu mô trước tách nhau từng vùng, trên mặt không còn vi nhung mao. Nhân tế bào dẹt và có mật độ điện tử nhạt; chất nhiễm sắc trong nhân cũng như các thành phần trong bào tương không rõ cấu trúc. Lớp trung gian của biểu mô trước và tế bào lớp đáy liên kết với nhau lỏng lẻo: khoảng gian bào rộng, mất thể liên kết. Trong tế bào, khoảng quanh nhân giãn rộng, bào tương có rất nhiều không bào. Bào quan bị tổn thương với nhiều mức độ: ty thể thoái hóa (trương, mất mào, biến dạng, hốc hóa), lưới nội bào khó

nhận dạng. Thể bán liên kết ở từng vùng của tế bào lớp đáy không nhận rõ (*ảnh 1*).

Ở mô nền giác mạc, nhiều khoảng trống kích thước khác nhau xuất hiện giữa các lớp và trong lớp sợi collagen. Trong bào tương, keratocyt có nhiều không bào; ty thể trương to, mất mào và lưới nội bào có hạt giãn rộng, đứt đoạn. Khoảng quanh nhân của các keratocyt giãn rộng.

** Sau 15 ngày bị bỏng:*

Các tế bào biểu mô trước bị tổn thương với mức độ khác nhau. Một số vùng trong mô nền có dấu tích của tế bào bị hủy hoại, là những đám bào quan biến dạng vùi vào trong chất nền và xen giữa các sợi collagen. Lớp sợi collagen chưa đều, vẫn còn phù nề, trương nhẹ và tách lớp.

** Sau 28 ngày bị bỏng:*

Ở thời điểm này, thể hiện rõ sự phục hồi của giác mạc. Mật tự do tế bào lớp bề mặt của biểu mô đã có vi nhung mao ngắn. Khoảng gian bào còn giãn. Nhưng cấu trúc liên kết giữa các tế bào đã xuất hiện nhiều hơn so với ở thời điểm 15 ngày sau bỏng. Những tế bào lớp trung gian và tế bào đáy trong bào tương còn một số không bào, nhưng mật độ ty thể và hạt glycogen cao hơn so với thời điểm 15 ngày. Các bó xơ trương lực xuất hiện trong bào tương, tế bào biểu mô nhiều hơn, tẩm đặc của thể liên kết và thể bán liên kết nhận rõ (*ảnh 3*).

Ở mô nền, không còn thấy vùng mất cấu trúc trong chất nền hoặc giữa các lớp sợi collagen. Keratocyt có cấu trúc khá điển hình.

2. Đặc điểm siêu cấu trúc giác mạc thỏ vùng bị bỏng kiểm được chiếu laser He-Ne ở một số thời điểm.

** Sau 5 ngày bị bỏng được chiếu laser He-Ne:*

Lớp tế bào trên bề mặt biểu mô trước có 2 loại, sáng màu và sẫm màu (*ảnh 2*). Ở mật tự do, tế bào sẫm màu nhiều vi nhung mao, trong bào tương có nhiều xơ trương lực, lưới nội bào giãn rộng và một số hốc

trống trong bào tương. Bào tương tế bào lớp trung gian rất giàu lưới nội bào có hạt, ribosom tự do và đám hạt glycogen. Bào tương tế bào lớp đáy chứa rất nhiều hạt glycogen, lưới nội bào có hạt và nhiều bó xơ trương lực. Các hình thức liên kết kiểu mạng, thể liên kết và thể bán liên kết nhận thấy rõ ràng.

Ở mô nền, các lớp sợi collagen cấu tạo điển hình, không có hốc. Keratocyt có lưới nội bào, ribosom và ty thể phát triển mạnh, có nhiều nhánh bào tương. Một số đại thực bào với các thể thực bào.

** Sau 15 ngày bị bỏng được chiếu laser:*

Biểu mô có đầy đủ các lớp và hình ảnh siêu cấu trúc tương tự như ở giai đoạn 5 ngày, nhưng bào tương tế bào rất giàu hạt glycogen và bó xơ trương lực. Mật độ thể liên kết và thể bán liên kết cao hơn ở giai đoạn 5 ngày.

Ở mô nền giác mạc, các bó sợi collagen và keratocyt sắp xếp theo trật tự và có cấu trúc khá điển hình.

** Sau 28 ngày bị bỏng kiểm và được chiếu laser:*

Các tế bào biểu mô liên kết với nhau chặt chẽ với nhiều mạng liên kết và thể liên kết. Tế bào đáy gắn chặt với màng đáy. Trong bào tương, tế bào biểu mô, cấu trúc và mật độ các tế bào quan trở lại bình thường; chất vùi glycogen rất phong phú (*ảnh 4*).

Ở mô nền giác mạc, lớp sợi collagen sắp xếp theo trật tự điển hình; keratocyt rất giàu lưới nội bào có hạt và ribosom.

BÀN LUẬN

Hình ảnh tổn thương phổ biến ở các vùng giác mạc thỏ bị bỏng là: mối liên kết giữa tế bào mất hoặc giảm rõ và hình ảnh hốc hóa trong bào tương tế bào và trong mô nền giác mạc (*ảnh 1, 2*). Theo chúng tôi, chất kiểm trước hết phá hủy tế bào biểu mô và làm tan rã mối liên kết giữa tế bào biểu mô và giữa tế bào lớp đáy biểu mô với màng đáy. Các hình thái liên kết này có bản

chất là những protein màng và proteoglycan gian bào [4], rất dễ bị chất kiềm phá hủy [5]. Khi tế bào biểu mô giác mạc bị hủy hoại và các mối liên kết giữa tế bào bị tan rã, lúc này biểu mô giác mạc không còn là một lá chắn bảo vệ cho lớp sâu nữa. Hậu quả là mô nền và nội mô giác mạc bị tổn thương.

Chất kiềm dễ dàng qua màng bào tương tế bào biểu mô và tế bào keratocyt, làm tổn thương nhân và bào quan của các tế bào đó với mức độ khác nhau (mất các xo trương lực, khoảng quanh nhân giãn rộng, lượng ribosom và glycogen giảm hoặc mất, lưới nội bào có hạt và ty thể giãn rộng hoặc bị hốc hóa..)

Mặt khác, khi bị bỏng kiềm, tế bào đáy biểu mô giải phóng chất hoạt hóa plasminogen. Chất hoạt hóa này lại kích thích các tế bào sản xuất và tăng hoạt tính collagenase, đồng thời thu hút bạch cầu trung tính tập trung đến khu vực bỏng và chính chúng cũng giải phóng ra enzym phân hủy collagen [2], dẫn đến các lớp collagen bị tan rã, tạo nên những khoảng trống trong mô nền giác mạc.

Dấu hiệu hồi phục cấu trúc giác mạc thô bị bỏng kiềm, ở mức siêu vi thể được thể hiện nhờ các thành phần tế bào, mô hồi phục và xuất hiện các tế bào mới. Những bào quan tham gia tổng hợp protein như ribosom, lưới nội bào có hạt, ty thể và vật chất sinh năng lượng là chất vùi glycogen tăng dần về mật độ theo thời gian. Ở tế bào biểu mô lớp bề mặt, số lượng vi nhung mao cũng tăng lên. Trong cùng một thời điểm, dấu hiệu hồi phục ở mô nền giác mạc luôn biểu hiện phong phú hơn ở biểu mô trước. Ở giác mạc thô được chiếu laser He - Ne so với giác mạc bị bỏng để tự hồi phục trong cùng một thời điểm nghiên cứu, dấu hiệu tổn thương nhẹ hơn và dấu hiệu hồi phục cũng sớm hơn. Kết quả nghiên cứu này tương tự nhận xét của T. Karu 1989 [6] về tác dụng kích thích sinh học của laser năng lượng thấp, thể hiện rõ ở các mô trong tình trạng dinh dưỡng kém (giác mạc là cấu trúc vô mạch lại bị tổn thương do

chất kiềm). Cũng theo tác giả này, bức xạ laser He - Ne dựa trên các phản ứng quang hóa đã hoạt hóa chức năng bào quan, kích thích quá trình chuyển hóa của keratocyt và kích thích chúng đẩy mạnh tạo collagen và chất nền của mô liên kết.

KẾT LUẬN

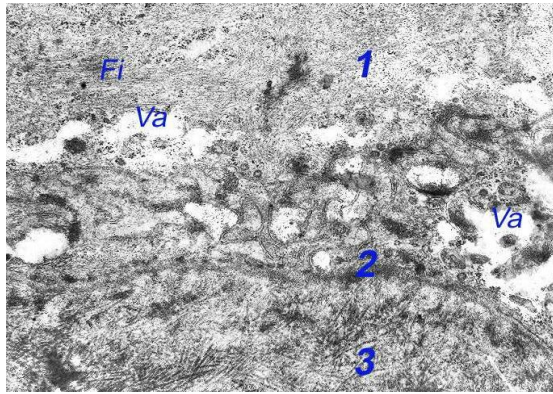
Bằng phương pháp hiển vi điện tử truyền qua, trên các lát cắt siêu mỏng của giác mạc thô bị bỏng kiềm khu vực chiếu laser He - Ne, nhận thấy:

- Chất kiềm gây tổn thương cho tầng mô giác mạc thô vùng bị bỏng ở những mức độ khác nhau: gây chết tế bào biểu mô bề mặt, giảm mạnh lượng glycogen trong bào tương tế bào, làm mất cấu trúc liên kết giữa các tế bào biểu mô, đồng thời gây thoái hóa bào quan tế bào và từng vùng mô nền chân bì giác mạc.

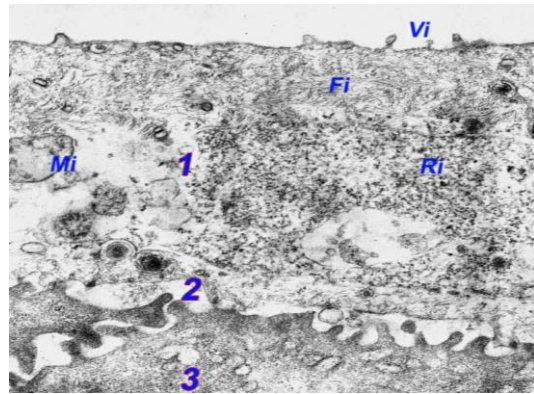
- Biểu hiện hồi phục cấu trúc siêu vi thể ở giác mạc thô bị bỏng được chiếu laser He - Ne tương tự, nhưng luôn sớm hơn so với ở giác mạc thô bị bỏng không chiếu laser.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

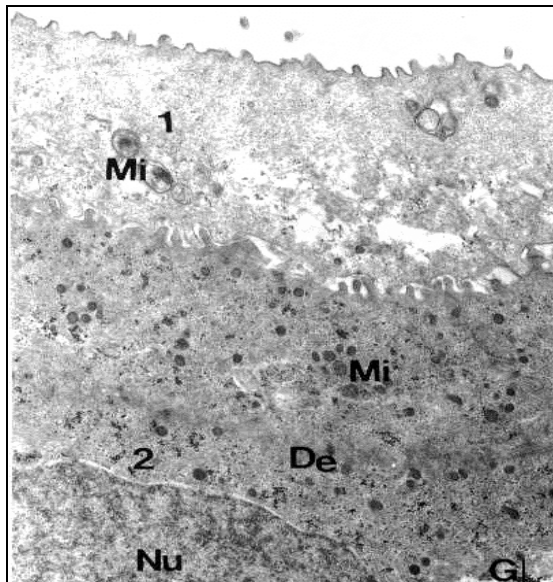
1. Dua H.S. Gomes J.A.P. Singh A. Corneal epithelial wound healing. British Journal of Ophthalmology. 1994, 78. pp.401-408.
2. Pavilaack M.A. Chang P.C; Soong H.K. Corneal alkali burn. In: Schachat A.P. at al. Current practice in Ophthalmology. Mosby Year Book. 1992, pp.33-47.
3. Omerod L.D. Mark B. Kenneth R.K. Standard models of corneal injury using alkali-Immured filter discs. Investigative Ophthalmology and Visua Science. 1998, Vol 30, 10, pp.2148-2153.
4. Junqueira L.C, Carneiro J. Kelley R.O. Basic histology. Appleton & Lange. California. 1989, pp.65-70.
5. Echinard C, Lataet J. Les brulures. Masson. 1993.
6. Karu T. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. Journal of Photochemistry and Photobiology. 1989, 3, pp.638-640.



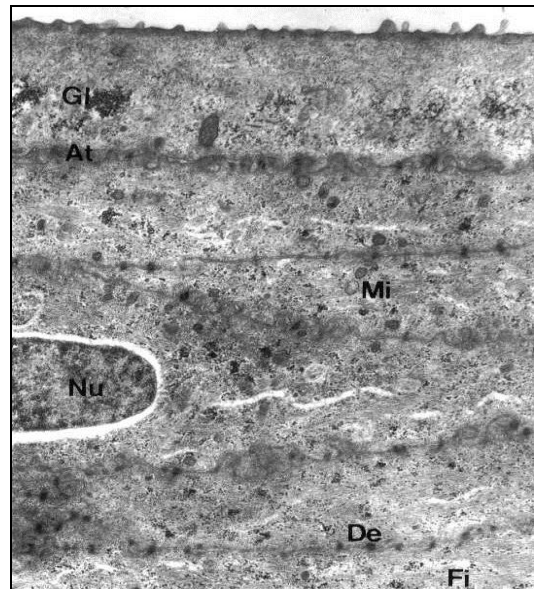
Ảnh 1: Giác mạc thô sau bỏng kiềm 5 ngày, không điều trị: 1: Tế bào đáy biểu mô; F: Xơ trương lực; Va: Vùng mất cấu trúc trong bào tương; 2: Màng đáy (không điển hình, các thể bán liên kết thưa); 3: Sợi collagen trong mô nền. (Nhóm C5; x 21.000)



Ảnh 2: Lớp nông của biểu mô giác mạc thô sau bỏng kiềm được chiếu laser He-Ne 5 ngày: 1: Tế bào bề mặt (sáng màu); 2: Khoảng gian bào (giãn rộng); 3: Tế bào lớp nông (sẫm màu); V:- Vi nhung mao; Fi: Xơ trương lực; Ri: Đám ribosom; Mi: Ty thể trương. (Nhóm L5; x 21.000).



Ảnh 3: Biểu mô giác mạc thô vùng bỏng kiềm, sau 28 ngày không điều trị: 1: Tế bào bề mặt; 2: Tế bào lớp trung gian; Mi: Ty thể; De: Thể liên kết; GL: Glycogen; Nu: Nhân tế bào. (Nhóm C28; x 15.000)



Ảnh 4: Biểu mô giác mạc thô, sau bỏng kiềm được chiếu laser He-Ne với mật độ công suất 2 mW/cm² 28 ngày: GL: Glycogen; At: Mộng liên kết; Mi: Ty thể; Nu: Nhân tế bào lớp trung gian; De: Thể liên kết; Fi: Xơ trương lực. (Nhóm L28; x15.000).