

УДК 617.723+617.735-085.849.19-778.317-092.9

Ультроструктурные изменения хориоретинального комплекса кроликов после воздействия лазерного излучения с длиной волны 577 нм

С. А. Федченко, врач-офтальмолог, аспирант, О. С. Задорожный, канд. мед. наук,
Н. И. Молчанюк, канд биол. наук, А. Р. Король, д-р мед. наук

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П.Филатова НАМН Украины»; Одесса (Украина)

E-mail: laserfilatova@gmail.com

Актуальность. На сегодняшний день остается нерешенным вопрос подбора параметров лазерного излучения при проведении субпороговой лазерной коагуляции сетчатки без видимых офтальмоскопических изменений глазного дна.

Цель. Изучить ультроструктурные изменения хориоретинального комплекса после воздействия лазерного излучения с длиной волны 577 нм в различных режимах.

Материал и методы. Эксперимент проводился на 6 кроликах (12 глаз). Использовался лазер с длиной волны 577 нм. Лазерное воздействие выполнялось в различных режимах. Проводилось электронно-микроскопическое исследование глаз кроликов.

Результаты. Лазерная коагуляция в классическом режиме повреждает клетки пигментного эпителия сетчатки, все отделы фоторецепторов и хориокапилляры, селективная лазерная коагуляция – клетки пигментного эпителия сетчатки, наружные и внутренние сегменты фоторецепторных клеток, микроимпульсная лазерная коагуляция с 50% мощности от порогового воздействия повреждает преимущественно апикальные отделы клеток пигментного эпителия сетчатки и наружные сегменты фоторецепторов.

Вывод. Лазерное воздействие на структуры сетчатки излучением с длиной волны 577 нм в микроимпульсном режиме является наиболее щадящим для фоторецепторов и хориокапилляров в сравнении с классической и селективной лазерной коагуляцией и может быть использовано в клинике как наименее инвазивное лазерное воздействие на хориоретинальный комплекс.

Ключевые слова:

хориоретинальный комплекс, лазерное излучение, ультроструктурные изменения, глаз кролика

Актуальность. В настоящее время одновременно с появлением современных лазерных технологий лечения патологии глазного дна развиваются теории, объясняющие механизм действия различных режимов лазерного излучения на внутриглазные структуры. Термический механизм повреждающего действия тканей глазного дна является универсальным для лазерного излучения инфракрасного и видимого диапазонов спектра [10].

Известно, что классическая лазерная коагуляция сетчатки сопровождается риском побочных эффектов и может приводить к нарушениям полей зрения, снижению контрастной чувствительности и развитию хориоидальной неоваскуляризации. В настоящее время считается, что для получения лечебного эффекта лазерного воздействия нет необходимости повреждения всех слоев сетчатки. Щадящие лазерные методики являются многообещающей альтернативной технологией лечения заболеваний глазного дна [9].

Однако при проведении щадящих лазерных воздействий без видимых офтальмоскопических изменений глазного дна остается нерешенным вопрос подбора параметров лазерного излучения.

Цель данной работы – изучить ультроструктурные изменения хориоретинального комплекса после воздействия лазерного излучения с длиной волны 577 нм в различных режимах (классический, селективный, микроимпульсный).

Материал и методы

Исследование проводилось на базе отдела по изучению биологического действия и использования лазеров в офтальмологии ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П.Филатова НАМН Украины» на 6 кроликах (12 глаз) породы шиншилла. Опытную группу составили 4 кролика (8 глаз). В качестве контроля использовался материал интактных животных (2 кролика, 4 глаза). Масса животных колебалась в пределах 2,5-3,5 кг. Животные содержались в стандартных условиях и на стандартном рационе питания. Всем экспериментальным животным проводилась биомикроскопия и офтальмоскопия. При проведении лазерных вмешательств применялся наркоз в виде

внутримышечных инъекций 10% раствора тиопентала натрия в дозе 1,0 мл на 1 кг массы животного. На подготовительном этапе в оба глаза инстиллировали 0,5% раствор проксиметакаина гидрохлорида. Следуя правилам асептики и антисептики, после вмешательства кроликам проводились инстилляции 20% раствора сульфацил-натрия и 0,3% раствора офлоксацина.

Все лазерные вмешательства выполнялись одним хирургом через центральную часть классической трёхзеркальной линзы Гольдмана. Размер лазерного пятна составлял 200 мкм. Два кролика были выведены из эксперимента через сутки, 2 кролика – через 14 дней.

В эксперименте использовался лазер Quantel Medical Supra 577 с длиной волны 577 нм. Особенностью данного устройства является использование оптической накачки, позволяющей выполнять процедуры с микросекундными экспозициями.

При выполнении пороговой коагуляции коагуляты наносились в шахматном порядке с экспозицией 0,1 секунды и минимальным промежутком без перекрытия. Подбор мощности осуществлялся до появления ожога 1 степени по L'Esperance в зоне воздействия.

При селективной коагуляции серия из 10 импульсов наносилась вдоль миелиновых волокон с экспозицией каждого импульса 0,01 секунды и скважностью 0,1 секунды до появления минимально видимого коагулята, затем мощность уменьшалась до исчезновения коагулята, который не проявлялся в течение одной минуты после воздействия.

При выполнении микроимпульсных воздействий лазер переводился в микроимпульсный режим с параметрами: длительность серии импульсов – 0,3 секунды, полезный цикл составлял – 15%, длительность микроимпульса – 0,17 мс, скважность – 1 мс. Производился подбор мощности вдоль миелиновых волокон до появления ожога 1 степени по L'Esperance. Мощность воздействия при этом уменьшалась на 25%, 50% или 75%.

Электронно-микроскопическое исследование глаз кроликов проведено на базе лаборатории патоморфологии и электронно-микроскопических исследований ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П.Филатова НАМН Украины». В качестве контроля использовались электронно-микроскопические фотографии нормальной хориоидеи и сетчатки кролика.

Для электронно-микроскопического исследования образцы ткани фиксировались в 2,5% растворе глutarальдегида на фосфатном буфере при значении pH - 7,4 с последующей дофиксацией 1% раствором осмиевой кислоты с тем же pH буферного раствора. Затем образцы обезвоживались в спиртах восходящей концентрации. Пропитывание материала и его заключение производилось в смеси эпон-аралдит. Ультратонкие срезы окрашивались растворами уранилацетата и цитрата свинца. Просматривались и фотографировались срезы в электронном микроскопе ПЭМ-100-01.

Работа с экспериментальными животными проводилась согласно Европейской конвенции о защите

позвоночных животных, используемых для исследовательских и других научных целей (Страсбург, 1986), и закону Украины «О защите животных от жестокого обращения» (2006). Исследование было одобрено биоэтическим комитетом ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова НАМН Украины».

Результаты

Через 1 сутки после порогового воздействия желтым лазером отмечено расширение хориокапилляров, истончение эндотелиальных клеток. Часть клеток пигментного эпителия сетчатки (ПЭС) также подверглась деструкции, часть мембран вакуолизированы. Апикальная область оторвана вместе с фагосомами и фрагментами наружных сегментов фоторецепторных клеток (ФК) (рис. 1). В интеррецепторном матриксе (ИРМ) лежат фрагменты клеток ПЭС, наружных сегментов фоторецепторных клеток (НС ФК) и внутренних сегментов фоторецепторных клеток (ВС ФК).

Через 1 сутки после селективного воздействия лазером в очаге воздействия наблюдается разрушение клеток ПЭС. Центральные и апикальные области клеток отсутствуют или вакуолизированы. Содержимое хориокапилляров уплотнено, эндотелиальные стенки истончены. Выражен отёк интеррецепторного матрикса. В последнем лежат фрагменты мембран дисков наружных сегментов. Рядом с вышеописанными структурами располагаются клетки ПЭС с вакуолизацией мембранных структур цитоплазмы и разрушением апикальной области. Фрагменты наружных сегментов ФК заполняют пространство у клеток ПЭС (рис. 2). В центре очага наблюдается межклеточный отёк ФК вплоть до наружной пограничной мембраны. Рядом, где отёк менее выражен, он охватывает, в основном,

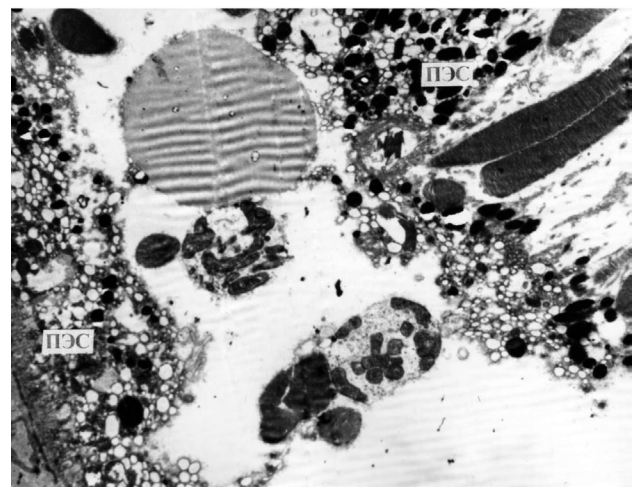


Рис. 1. Ультраструктура пигментного эпителия сетчатки кролика через 1 сутки после классического порогового лазерного воздействия. Разрыв клетки пигментного эпителия сетчатки. Электронная микрофотография: X 3 000.

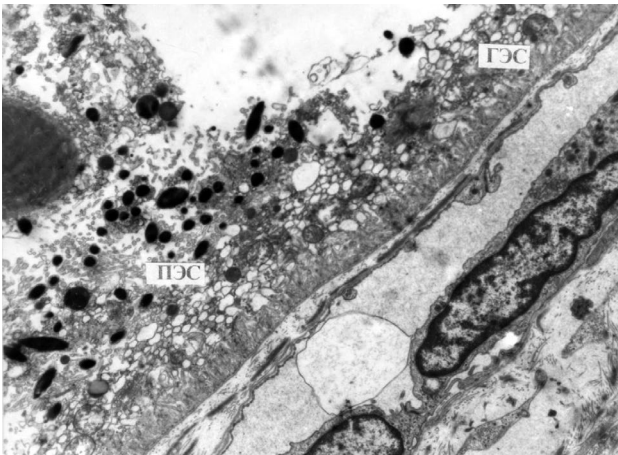


Рис. 2. Ультраструктура пигментного эпителия сетчатки кролика через 1 сутки после селективного лазерного воздействия. Деструкция участка апикальной области клетки пигментного эпителия. Электронная микрофотография: X 4 000.

область НС ФК. Остальные отделы ФК, включая ядра фоторецепторных клеток (ЯФК), сохранены.

Через 14 дней после селективного воздействия желтым лазером у большей части клеток ПЭС ультраструктура практически восстановлена. Цитоплазма клеток отличается обилием органелл: рибосом, полисом, элементов зернистой эндоплазматической сети (ЗЭС) и гладкой эндоплазматической сети (ГЭС), митохондрий. В клетках хорошо развита апикальная область и её контакты с наружными сегментами ФК. Компенсаторно-восстановительные процессы в клетках ПЭС очень характерны для материала этого срока. Ультраструктура ФК в целом нормализована.

Через 1 сутки после микроимпульсного воздействия лазером при мощности 25% от порогового воздействия большая часть клеток ПЭС близка к норме, а повреждений фоторецепторов не выявлено. Через сутки после микроимпульсного воздействия желтым лазером при мощности 50% от порогового воздействия большая часть клеток ПЭС и прилежащие хориокапилляры (ХК) близки к норме. Часть же клеток ПЭС с повреждением апикальной области, уменьшением микровилл и фагосом, гидропическими изменениями. В слое ФК наблюдаются отдельные разрушенные клетки. Рядом располагаются более сохраненные ФК. При мощности 75% от порогового воздействия обнаружены повреждения центральных и апикальных областей клеток ПЭС, а также наружных сегментов ФК.

Через 14 дней после микроимпульсного воздействия желтым лазером при мощности 25% от порогового воздействия клетки ПЭС близки к норме, ФК имеют нормальную ультраструктуру. Через 14 дней после микроимпульсного воздействия желтым лазером при мощности 50% от порогового воздействия ультраструктурные исследования показали, что ХК несколько расширены и близки к нормальным. Большая часть клеток ПЭС близка к норме. В слое ПЭС еди-

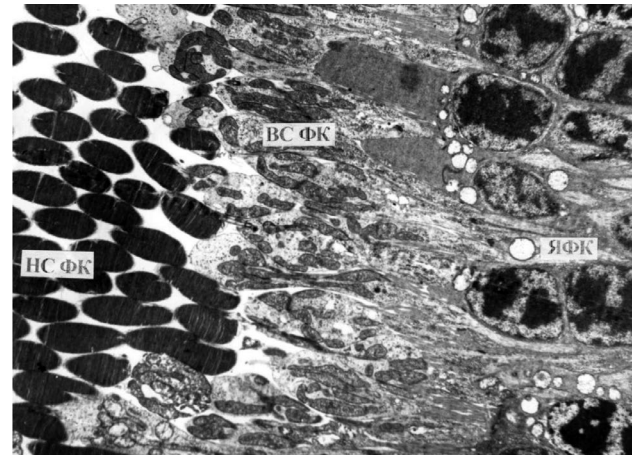


Рис. 3. Ультраструктура фоторецепторных клеток сетчатки кролика через 14 суток после микроимпульсного лазерного воздействия при мощности 50% от порогового воздействия. Нормальная ультраструктура фоторецепторных клеток. Электронная микрофотография: X 2500

ничные клетки подверглись деструкции, в основном, в апикальной области. В цитоплазме выражены мелковезикулярные гидропические изменения. Вместе с тем, часть клеток восстанавливает свою структуру, активизируется и в них выражен усиленный фагоцитоз обломков НС ФК. В слое ФК все отделы клеток хорошо сформированы и имеют нормальную ультраструктуру (рис. 3). При мощности 75% от порогового воздействия обнаружены повреждения всех отделов клеток ПЭС и ФК.

Обсуждение

Насколько нам известно, сегодня день в мире не существует единого подхода к проведению микроимпульсной лазерной коагуляции сетчатки. Так, при анализе предыдущих исследований, посвященных изучению субпороговых воздействий с использованием 577 нм лазера, были обнаружены различные точки зрения на применение этой технологии [1-9].

Roider J. с соавторами изучали механизмы селективного повреждения пигментного эпителия сетчатки, используя повторяющиеся субпороговые импульсы, в экспериментах на кроликах. Было отмечено, что селективность лазерного воздействия может быть достигнута применением импульсов более коротких, чем время, необходимое для нагревания окружающих тканей, но достаточное для повреждения определенных структур. При этом не происходит значительного распространения тепла из зоны лазерного воздействия в окружающие ткани. Полученные результаты гистологического исследования продемонстрировали существенные отличия между пороговой лазерной коагуляцией и селективным методом лазерного воздействия. В обоих случаях тяжелые повреждения локализовались на уровне пигментного эпителия сетчатки. В слое пигментного эпителия отмечено повреждение клеток ПЭС с последующей их заменой монослоем

новых клеток пигментного эпителия сетчатки. После воздействия повторяющихся коротких импульсов фоторецепторы расположены нормально и большинство из них выглядят неповрежденными. Хориокапилляры функционально состоятельны и обнаруживаются интактные эритроциты. После порогового воздействия слой фоторецепторов однородно разрушен, наблюдаются явления повреждения в хориокапиллярах. Отмечается минимальный воспалительный ответ после субпорогового воздействия, в отличие от порогового воздействия, при котором в поврежденном слое фоторецепторов были обнаружены макрофаги, фрагменты клеток ПЭС, лимфоциты [5, 6, 7].

Н. В. Пасечникова и соавторы применили методику селективного лазерного воздействия на ПЭС в миллисекундном варианте с длиной волны 532 нм для лечения диабетического отека макулы и другой патологии глазного дна [1]. Аналогичным образом Lavinsky D. и Palanker D. для щадящего воздействия лазерным излучением с длиной волны 577 нм использовали 15 мс импульсы с целью получения минимального видимого ожога, а затем, уменьшив мощность до 30% от пороговой, проводили лечение больных хронической центральной серозной хориоретинопатией [3].

Yadav N. с соавторами для подбора индивидуальной мощности микроимпульсного лазерного 577 нм воздействия предлагают сначала использовать классический режим коагуляции с нанесением одиночных аппликаций (диаметр пятна 100 мкм, экспозиция - 0,2 с) до появления слабого видимого ожога сетчатки. Затем, используя те же установки лазера, но снизив мощность вдвое, рекомендуют переходить в микроимпульсный режим и проводить лечебную процедуру [9]. Т. А. Романова предлагает после подбора пороговых параметров в классическом режиме, переходить в микроимпульсный режим, увеличивая мощность излучения в микроимпульсном режиме вдвое [2]. Однако такой подход имеет определенные сложности, поскольку в таком варианте подбора индивидуальной мощности трудно спрогнозировать, как изменятся параметры лазерного воздействия при переходе в микроимпульсный режим, поскольку происходит изменение сразу двух параметров лазерного воздействия. Изменения касаются как экспозиции импульса, так и мощности излучения.

Maia A. также демонстрирует эффективность терапевтического воздействия лазерным излучением (577 нм) в микроимпульсном режиме у больных центральной серозной хориоретинопатией. Однако в своей работе не указывает методику подбора индивидуальных параметров воздействия [4].

Scholz P. с соавторами подбирали индивидуальный порог мощности лазерного воздействия в области нормальной сетчатки в микроимпульсном режиме. Мощность постепенно увеличивалась до появления минимально видимого ожога сетчатки. Когда порог был зарегистрирован, мощность излучения снижалась

вдвое и с этими параметрами оказывали воздействие на пораженный участок сетчатки [8]. Такой вариант подбора индивидуальных параметров мы считаем наиболее приемлемым, т.к., подбирая пороговое значение мощности сразу в микроимпульсном режиме, мы изменяем лишь один параметр воздействия (мощность излучения) при переходе к терапевтическому воздействию. Таким образом, воздействие лазером в щадящем микроимпульсном варианте при отсутствии видимых коагулятов становится более прогнозируемым.

Анализ проведенного электронно-микроскопического исследования показал, что использованные параметры микроимпульсного излучения желтого лазера при мощности 50% от порогового воздействия вызывают через 1 сутки лёгкие реактивные изменения, в основном, в апикальной части клеток пигментного эпителия сетчатки. Эти изменения являются обратимыми и через 14 суток в изученных структурах практически не определяются.

Селективное лазерное воздействие отличается более глубоким повреждением клеток пигментного эпителия сетчатки в направлении сосудистой оболочки, вплоть до их разрушения, а также повреждением наружных сегментов фоторецепторов без вовлечения их ядерных отделов. С этим связана возможность восстановления ультраструктуры ФК. Клеткам ПЭС также свойственны мощные способности к компенсаторно-восстановительным, в данном случае, внутриклеточным процессам, что ярко проявляется через 14 суток после воздействия.

Пороговое классическое лазерное воздействие отличается наиболее грубыми и необратимыми изменениями клеток пигментного эпителия сетчатки, всех отделов фоторецепторов и хориокапилляров.

Заключение

Лазерное воздействие на пигментный эпителий сетчатки излучением с длиной волны 577 нм в микроимпульсном режиме с использованием 50% от пороговой мощности является наиболее щадящим для фоторецепторов и хориокапилляров в сравнении с классической и селективной лазерной коагуляцией и может быть применено в клинике как наименее инвазивное лазерное воздействие на хориоретинальный комплекс.

Различные режимы коагуляции лазером с длиной волны 577 нм позволяют выбрать необходимую глубину поражения хориоретинального комплекса. Так, классическая лазерная коагуляция повреждает клетки пигментного эпителия, все отделы фоторецепторов и хориокапилляры, селективная лазерная коагуляция – клетки пигментного эпителия сетчатки, наружные и внутренние сегменты фоторецепторных клеток, микроимпульсная лазерная коагуляция с 50% мощности от порогового воздействия повреждает преимущественно апикальные отделы клеток пигментного эпителия сетчатки и наружные сегменты фоторецепторов.

Через 14 дней после микроимпульсного лазерного (577 нм) воздействия на пигментный эпителий сетчатки в режиме использования 50% от пороговой мощности происходит восстановление ультраструктуры хориоретинального комплекса.

Литература

1. **Пасечникова Н. В.** Селективная лазерная коагуляция пигментного эпителия сетчатки при лечении диабетической макулопатии / Н. В. Пасечникова, В. А. Науменко // Офтальмологический журнал, 2003. – № 2. – С. 42-46.
2. **Романова Т. А.** Ультраструктурные изменения хориоидеи и пигментного эпителия сетчатки кроликов после субпорогового лазерного воздействия лазерами, генерирующими излучение с длиной волны 532, 577 и 810 нм с использованием миллиимпульсного и микроимпульсного режимов работы лазера / Т. А. Романова // Харківська хірургічна школа, 2014. – № 4. – С. 74-79.
3. **Lavinsky D.** Nondamaging photothermal therapy for the retina: initial clinical experience with chronic central serous retinopathy / D.Lavinsky, D.Palanker // Retina, 2015. – Vol. 35(2). – P. 213-22.
4. **Maia A.** A New Treatment for Chronic Central Serous Retinopathy // Retina Today, 2010. – Vol. January-February(1). – P.1-3.
5. **Roider J.** Response of the retinal pigment epithelium to selective photocoagulation / J.Roider, N.Michaud, T.Flotte, R.Birngruber// Arch. Ophthalmol. – 1992. – Vol. 110. – № 12. – P.1786-1792.
6. **Roider J.** Histologie von Netzhautläsionen nach kontinuierlicher Bestrahlung und nach selektiver Mikrokoagulation des retinalen Pigmentepithels / J. Roider, N. Michaud, T. Flotte, et al. // Ophthalmologie. – 1993. – Vol. 90. – P.274-278.
7. **Roider J.** Subthreshold (retinal pigment epithelium) photocoagulation in macular diseases: a pilot study / J. Roider, R. Brinkmann, C. Wirbelauer, et al. // Br. J. Ophthalmol. – 2000. – Vol. 84. – № 1. – P.40-47.
8. **Scholz P.** Subthreshold Micropulse Laser (577 nm) Treatment in Chronic Central Serous Chorioretinopathy / P. Scholz, L. Ersoy, C. J. F. Boon et al. // Ophthalmologica, 2015. – Vol. 234. – P. 189-194.
9. **Yadav N.** Sub-threshold micropulse yellow laser (577 nm) in chronic central serous chorioretinopathy: safety profile and treatment outcome / N. Yadav, C. Jayadev, A. Mohan, et al. // Eye (Lond), 2015. – Vol. 29. – P. 258-264.
10. **Youssef P. N.** Retinal light toxicity / P.N.Youssef, N.Sheibani, D.M.Albert // Eye (Lond), 2011. – Vol. 25(1). – P. 1-14.

Поступила 31.05.2017

Ультраструктурні зміни хоріоретинального комплексу кроликів після впливу лазерного випромінювання з довжиною хвилі 577 нм

Федченко С. О., Задорожний О. С., Молчанюк Н. І., Король А. Р.

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П.Филатова НАМН Украины»; Одесса (Украина)

Актуальність. На сьогоднішній день залишається невирішеним питання підбору параметрів лазерного випромінювання при проведенні субпорогової лазерної коагуляції сітківки без видимих офтальмоскопічних змін очного дна.

Мета. Вивчити ультраструктурні зміни хоріоретинального комплексу після впливу лазерного випромінювання з довжиною хвилі 577 нм в різних режимах.

Матеріал та методи. Експеримент проводився на 6 кроликах (12 очей). Використовувався лазер з довжиною хвилі 577 нм. Лазерний вплив виконувався в різних режимах. Проводилось електронно-мікроскопічне дослідження очей кроликів.

Результати. Лазерна коагуляція в класичному режимі пошкоджує клітини пігментного епітелію сітківки,

всі відділи фоторецепторів і хоріокапіляри, селективна лазерна коагуляція – клітини пігментного епітелію сітківки, зовнішні і внутрішні сегменти фоторецепторних клітин, мікроімпульсна лазерна коагуляція з 50% потужності від порогового впливу ушкоджує переважно апікальні відділи клітин пігментного епітелію сітківки і зовнішні сегменти фоторецепторів.

Висновок. Лазерний вплив на структури сітківки випромінюванням з довжиною хвилі 577 нм в мікроімпульсному режимі є найбільш безпечним для фоторецепторів і хоріокапілярів в порівнянні з класичною і селективною лазерною коагуляцією і може бути використаний в клініці як найменш інвазивне лазерне втручання в хоріоретинальний комплекс.

Ключові слова: хоріоретинальний комплекс, лазерне випромінювання, ультраструктурні зміни, очі кролика