

Изучение характера тканевого ответа хориоретинального комплекса на субпороговое микроимпульсное лазерное воздействие в эксперименте

В.С. Акопян¹, Г.Ф. Качалина², Е.К. Педанова², Н.С. Семенова¹, К.А. Кузьмин¹, Д.А. Буряков²

¹ Кафедра офтальмологии факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва;

² ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Москва

РЕФЕРАТ

Цель. Изучить характер тканевого ответа структур хориоретинального комплекса (ХРК) на субпороговое микроимпульсное лазерное воздействие с длиной волны 577 нм (СМЛВ) в эксперименте и определить наиболее безопасные энергетические параметры его использования.

Материал и методы. Морфологическое исследование осуществлялось с целью подбора технических параметров лазерного излучения, при использовании которых не наблюдается повреждения целостности структуры ХРК. Исследования проводилось на 8 глазах 8 кроликов после СМЛВ в сроки 1 сутки и 1 мес. Лазерное воздействие осуществлялось с использованием одного из четырех вариантов сочетания технических параметров излучения.

Биологический ответ тканей ХРК изучался при помощи иммуногистохимического исследования, которое проводилось на 2 глазах 2 кроликов для определения экспрессии пигментного фактора эпителиального происхождения (PEDF) в срок 1 сутки после СМЛВ.

Результаты. Данные морфологического исследования свидетельствуют об отсутствии изменений целостности струк-

тур ХРК при использовании низких энергетических параметров СМЛВ, в частности, скважности 5% и длительности пакета 100 мс. Результаты иммуногистохимического исследования показали, что одним из эффектов СМЛВ является повышение экспрессии PEDF клетками РПЭ.

Заключение. В эксперименте изучены особенности тканевого ответа ХРК после СМЛВ. Определены наиболее безопасные технические параметры лазерного излучения с точки зрения целостности структуры сетчатки. Показано, что одним из биологических эффектов СМЛВ является усиление экспрессии PEDF в ранние сроки после лазерного воздействия. Изучение динамики экспрессии PEDF, сочетания PEDF/VEGF в отдаленные сроки после СМЛВ требует дальнейших экспериментальных исследований.

Ключевые слова: субпороговое микроимпульсное лазерное воздействие, иммуногистохимическое исследование, морфологическое исследование, пигментный фактор эпителиального происхождения, ретинальный пигментный эпителий. ■

Авторы не имеют финансовых или имущественных интересов в упомянутых материале и методах.

Офтальмохирургия. – 2015. – № 3. – С. 54-58.

Для корреспонденции:

Акопян Владимир Сергеевич, докт. мед. наук, профессор, зав. кафедрой офтальмологии;

Семенова Наталья Сергеевна, канд. мед. наук, доцент кафедры офтальмологии;

Кузьмин Кирилл Анатольевич, аспирант кафедры офтальмологии

Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова

Адрес: 119192, Москва, Ломоносовский проспект, 31, корп. 5

Тел.: (495) 932-8814. E-mail: info@fbm.msu.ru

Качалина Галина Федоровна, канд. мед. наук, зав. отделом лазерной хирургии сетчатки;

Педанова Елена Константиновна, канд. мед. наук, научн. сотрудник отдела лазерной хирургии сетчатки;

Буряков Дмитрий Анатольевич, аспирант отдела лазерной хирургии сетчатки

ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России

Адрес: 127486, Москва, Бескудниковский бульвар, 59а

E-mail: info@mntk.ru

ABSTRACT

Evaluation of chorioretinal complex tissue response on subthreshold micropulse yellow laser (577-nm) photocoagulation of retina in experimentV.S. Akopyan¹, G.F. Kachalina², E.K. Pedanova², N.S. Semenova¹, K.A. Kuzmin¹, D.A. Buryakov²¹ The Lomonosov Moscow State University, School of Medicine, Department of Ophthalmology, Moscow;² The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow

Purpose. To evaluate chorioretinal complex (CRC) tissue response on subthreshold micropulse yellow laser (577-nm) photocoagulation (SMYLP) of rabbit retina in experiment and to determine its safest laser exposure energy settings.

Material and methods. Morphological study was performed to determine the safest laser exposure settings, which do not cause CRC structure damage. The study was carried out in 8 eyes of 8 rabbits 24 hours and 1 month after the SMYLP. The SMYLP was performed in four combinations of laser exposure settings. Four rabbits were sacrificed at 24 hours post-treatment and the other four were sacrificed at 1 month post-treatment to reveal morphological changes of CRC.

The CRC tissue response was evaluated during immunohistochemical study in two eyes (2 rabbits) after SMYLP, wherein the expression of pigment derived epithelium factor (PEDF) 24 hours post-treatment was assessed.

Results. The morphological study data showed no retinal structure changes after SMYLP using low-level energy settings, including 100ms train duration and 5% duty cycle.

Immunohistochemical study revealed expression of PEDF after SMYLP using selected laser exposure settings compared to fellow (intact) eyes at 24 hours time point.

Conclusions. SMYLP is safe for retinal structure integrity while using low laser exposure settings. One of the significant biological effects of SMYLP is the PEDF expression in short-term post-treatment. Nevertheless, further long-term investigation of PEDF expression and PEDF/VEGF ratio after SMYLP should be conducted.

Key words: *subthreshold micropulse yellow laser photocoagulation, immunohistochemical study, morphological study, pigment epithelium derived factor, retinal pigment epithelium.* ■

No author has a financial or proprietary interest in any material or method mentioned.

Ophthalmosurgery.- 2015.- No. 3.- P. 54-58.

Сосудистые заболевания глазного дна представляют собой сложную медико-социальную проблему, связанную с существенным, зачастую необратимым снижением зрительных функций [1]. Многообразие патогенетических путей развития обуславливает активный поиск ключевых звеньев патологического процесса, воздействие на которые позволило бы проводить эффективное лечение. К настоящему времени проведено большое количество исследований, в которых изучается эффективность различных методов, включающих в себя консервативное и хирургическое лечение, лазерные технологии. Лазерное лечение является одним из основных методов терапии таких сосудистых заболеваний глазного дна, как диабетическая ретинопатия, тромбоз вен сетчатки, центральная серозная хориоретинопатия, отечная макулопатия различного генеза, экссудативные формы возрастной макулодистрофии и др. [3,

7, 8]. Лазеркоагуляция сетчатки позволяет достичь регресса патологического процесса, стабилизировать, а в ряде случаев и улучшить зрительные функции. На сегодняшний день вопрос о механизме лечебного эффекта лазеркоагуляции изучен не до конца. Существуют предположения об уменьшении просачивания жидкости из микроаневризм, снижении общей потребности сетчатки в кислороде, регенерации клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) и др. [1, 2, 9, 15]. Однако пороговая лазеркоагуляция сетчатки, в частности при лечении макулярной патологии, имеет ряд ограничений в связи с термическим необратимым повреждением структур хориоретинального комплекса (ХРК). Лазеркоагуляция в данной зоне приводит к появлению скотом в центральном поле зрения, снижению контрастной чувствительности, ухудшению цветового зрения, а также, как показано рядом авторов, сопровождается выбросом провоспалительных

факторов, что также снижает её эффективность [10, 11, 19, 22, 24, 25]. Стоит отметить, что частое повторение сеансов лечения в связи с указанными побочными эффектами не представляется возможным [4]. Дальнейшее изучение лазерного воздействия на ХРК показало, что для получения тканевого ответа в ряде ситуаций нет необходимости в необратимом повреждении его структуры, и потому достичь терапевтического эффекта можно, используя низкие энергетические параметры [12, 14, 21]. Эволюция лазерных установок в данном направлении привела к появлению микроимпульсного режима излучения. Микроимпульсное лазерное излучение подразумевает доставку лазерной энергии в виде серии («пакета») ультракоротких микросекундных импульсов. Чередование периодов включения и выключения работы лазера внутри одного пакета позволяет достичь контролируемого повышения температуры в клетках-мишенях и избе-

жать их необратимого повреждение [4-6]. Помимо временных параметров микроимпульсного воздействия, важное значение имеют длина волны, на которой работает лазер, и мощность излучения. С учетом того, что излучение различных длин волн по-разному поглощаются структурами ХРК, для лечения сосудистых заболеваний глазного дна наиболее патогенетически ориентированным представляется использование желтого спектра излучения, поскольку оно имеет пик абсорбции энергии хроматофором меланином, содержащимся в клетках ретиального пигментного эпителия (РПЭ). Роль РПЭ в патогенезе сосудистых заболеваний глазного дна исследовалась многими учеными. Так, было показано, что клетки РПЭ выполняют барьерную, транспортную функции, необходимые для поддержания нормальной работы сетчатки [18, 20, 23]. В то же время они являются источником противовоспалительных и антипролиферативных факторов (интерлейкинов, пигментного фактора эпителиального происхождения PEDF и др.) [13, 17, 24, 26]. Подбор необходимой мощности лазерного излучения остаётся непростой задачей, поскольку оно должно иметь так называемый «субпороговый» характер, гарантирующий отсутствие коагуляционного некроза структур ХРК. Этой цели посвящены ряд работ по математическому моделированию, а также экспериментальные и клинические исследования [3, 6, 8, 10, 16, 17, 27]. Таким образом, субпороговое микроимпульсное лазерное воздействие с желтой длиной волны 577 нм (СМЛВ) проводится с целью контролируемого повышения температуры в клетках РПЭ до сублетального уровня, что стимулирует выработку ими ряда противовоспалительных цитокинов, участвующих в патогенезе сосудистых заболеваний глазного дна.

На сегодняшний день в литературе нами не найдено экспериментальных работ, в которых изучалась тканевая ответ ХРК на субпороговое микроимпульсное лазерное воздействие с длиной волны 577 нм, а также был бы обоснован выбор оптимальных энергетических параметров для его проведения, что и определило цель настоящего исследования.

ЦЕЛЬ

Изучить характер тканевого ответа структур ХРК на субпороговое микроимпульсное лазерное воздействие с длиной волны 577 нм в эксперименте и определить наиболее безопасные энергетические параметры его использования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В рамках эксперимента проводились морфологическое и иммуногистохимическое исследования ХРК кроликов после проведения СМЛВ с длиной волны 577 нм. Лазерному воздействию подвергался 1 глаз каждого кролика, парный (интактный) глаз служил контролем. Все животные – пигментированные кролики породы Шиншилла, возраст – около 6 мес., вес – 4-5 кг.

Морфологическое исследование проводилось с целью подбора наиболее оптимального сочетания технических параметров лазерного излучения, при использовании которых не происходит изменения целостности структуры ХРК. Полученные параметры в дальнейшем планировалось использовать при проведении иммуногистохимического исследования.

СМЛВ с длиной волны 577 нм проводилось на 8 глазах 8 кроликов с использованием одного из четырех вариантов сочетания технических параметров излучения:

- 1 вариант – длительность микроимпульса 100 мкс, длительность пакета 100 мс, скважность 5%, диаметр 100 мкм (2 глаза);
- 2 вариант – длительность микроимпульса 100 мкс, длительность пакета 200 мс, скважность 5%, диаметр 100 мкм (2 глаза);
- 3 вариант – длительность микроимпульса 100 мкс, длительность пакета 100 мс, скважность 10%, диаметр 100 мкм (2 глаза);
- 4 вариант – длительность микроимпульса 100 мкс, длительность пакета 200 мс, скважность 10%, диаметр 100 мкм (2 глаза).

В каждом случае мощность лазерного излучения подбиралась индивидуально после предварительного тестирования. Тестирование про-

водилось на расстоянии не менее 4 мм от зрительной лучистости. Подбор мощности излучения начинали после переключения работы лазерной установки в микроимпульсный режим с уровня 100 мВт, постепенно повышая его до появления едва заметного побеления, после чего мощность снижали в 2 раза и использовали для проведения СМЛВ. Лазерные аппликаты наносили в зоне 3 мм от зрительной лучистости в виде решетки с расстоянием не более 100 мкм между аппликатами. Животных выводили из эксперимента в сроки 1 сутки (4 глаза) и 1 мес. (4 глаза).

Иммуногистохимическое исследование осуществлялось с целью определения экспрессии PEDF после СМЛВ с длиной волны 577 нм. Технические параметры лазерного излучения для его проведения были определены в ходе морфологического исследования как наиболее безопасные с точки зрения целостности структур ХРК. Воздействию подвергались 2 глаза 2 кроликов, животных выводили из эксперимента спустя 1 сутки. Лазерные аппликаты наносились по всей сетчатке в зоне 3 мм сверху и снизу от зрительной лучистости.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные в ходе морфологического исследования данные показали, что при использовании технических параметров 1 варианта СМЛВ не происходит лазериндуцированного повреждения структур ХРК на обоих сроках наблюдения (рис. 1). Отсутствие изменений нормального строения ХРК также было отмечено после проведения лазерного воздействия по 2 варианту в срок 1 сутки (рис. 2а). После СМЛВ по 3 и 4 вариантам (рис. 3, 4) на обоих сроках наблюдения отмечалось разрушение фотосенсорного слоя (1), нарушение связей между клетками в наружном ядерном слое (2), увеличение межклеточных промежутков, визуализируются остатки ядер некротизировавшихся либо подвергшихся апоптозу клеток (3). Также было отмечено уменьшение толщины слоя нервных волокон (4). Степень указанных изменений была больше в глазах с 4 вариантом СМЛВ. Сход-

ные изменения структуры ХПК (1-4) также наблюдались в глазах кроликов после СМЛВ по 2 варианту в срок 1 мес. (рис. 2б), однако их выраженность была существенно меньше.

Таким образом, согласно результатам морфологического исследования, для проведения второго этапа эксперимента – иммуногистохимического исследования – было принято решение использовать технические параметры 1-го варианта СМЛВ.

Иммуногистохимическое исследование в первые сутки после лазерного воздействия продемонстрировало более интенсивное прокрашивание препарата (рис. 5а) по сравнению с интактным глазом (рис. 5б), что доказывает более высокое содержание PEDF в тканях ХПК.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведённого исследования подтвердили безопасность современной лазерной технологии микроимпульсного воздействия. Несмотря на то, что лазерные установки, работающие в желтом спектре излучения, уже начали применять в клинической практике, настоящее экспериментальное исследование впервые позволило обосновать определенные технические параметры, использование которых обеспечивает истинный субпороговый характер СМЛВ. Степень выраженности лазериндуцированных изменений структуры ХПК, по нашему мнению, вполне закономерно возрастала с увеличением лазерной нагрузки – длительности пакета и скважности, что можно объяснить эффектом тепловой суммации. При этом периоды выключения лазера между микроимпульсами были недостаточными для полной температурной релаксации клеток РПЭ, что приводило к их нагреву выше толерантного уровня, деструкции и апоптозу.

Изучению биологического ответа ХПК на микроимпульсное лазерное воздействие посвящён ряд экспериментальных работ. Наиболее показательным среди них можно считать сравнительное иммуногистохимическое исследование Alfred Yu и соавт., в котором показано увеличение экспрессии ряда

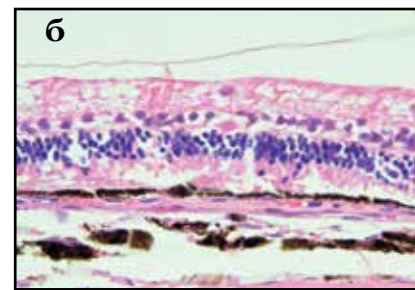
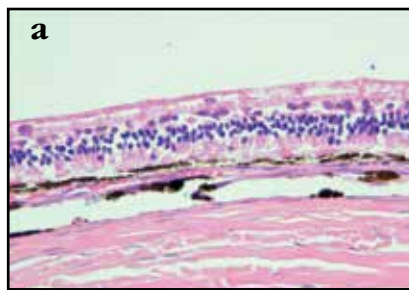


Рис. 1. Гистологический препарат ХПК после СМЛВ по 1 варианту: а) в срок 1 сутки; б) в срок 1 мес. Пояснения в тексте

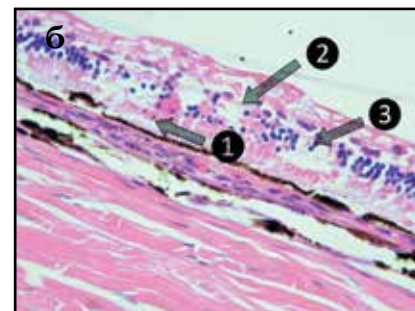
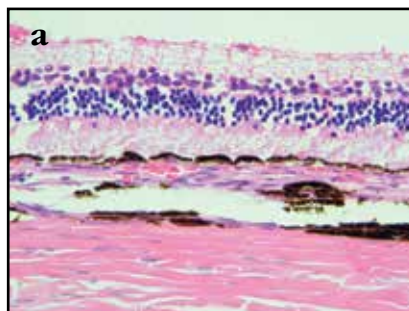


Рис. 2. Гистологический препарат ХПК после СМЛВ по 2 варианту: а) в срок 1 сутки; б) в срок 1 мес. Пояснения в тексте

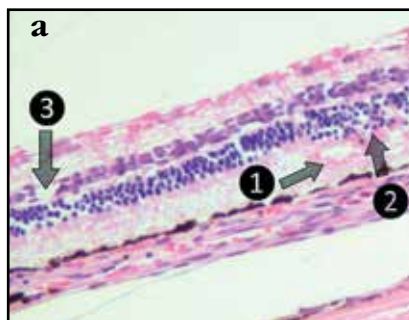


Рис. 3. Гистологический препарат ХПК после СМЛВ по 3 варианту: а) в срок 1 сутки; б) в срок 1 мес. Пояснения в тексте

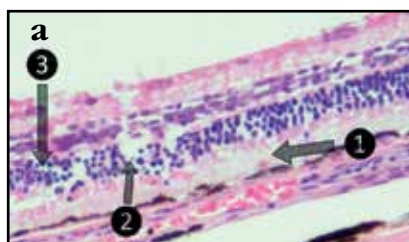


Рис. 4. Гистологический препарат ХПК после СМЛВ по 4 варианту: а) в срок 1 сутки; б) в срок 1 мес. Пояснения в тексте

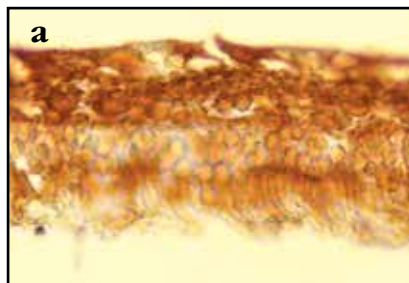


Рис. 5. Иммуногистохимический препарат ХПК: а) после СМЛВ по 1 варианту в срок 1 сутки; б) интактного глаза кролика в срок 1 сутки. Пояснения в тексте

цитокинов в ответ на субпороговое микроимпульсное лазерное воздействие с длинами волн 532 и 810 нм [27]. Однако, по нашему мнению, результаты данного исследования могли быть скомпрометированы лазеркоагуляцией с использованием непрерывного режима, которую авторы использовали для разметки зоны СМЛВ. Поэтому в проведенном нами эксперименте было решено отказаться от пороговой лазеркоагуляции и при проведении СМЛВ ориентироваться на топографию сетчатки кроликов (воздействие проводилось в зоне 3-4 мм сверху и снизу от зрительной лучистости). Выбор PEDF в качестве показателя тканевого ответа ХПК на лазерное воздействие не был случайным, поскольку данный цитокин, являющийся главным антагонистом сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), имеет важное значение в патогенезе сосудистых заболеваний глазного дна [20, 23]. Впервые полученные данные об экспрессии PEDF в срок 1 сутки после СМЛВ с длиной волны 577 нм представляются крайне важными в понимании механизмов его биологического действия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты экспериментального исследования субпорогового микроимпульсного лазерного воздействия свидетельствуют о его безопасности с точки зрения целостности структуры ХПК при использовании низкоэнергетических параметров СМЛВ. Одним из важных биологических эффектов СМЛВ в желтом спектре излучения является выраженная экспрессия PEDF в ранние сроки после лазерного воздействия. Изучение динамики экспрессии PEDF, а также соотношения PEDF/VEGF в отдаленные сроки после СМЛВ требует дальнейших экспериментальных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балашевич Л.И., Измайлов А.С. Диабетическая офтальмопатия. – СПб.: Человек; 2012. – 396 с.
2. Деуфраинс А., Дитце У., Юттэ А. и др. Световая коагуляция в лечении диабетиче-

ской ретинопатии // Вестник офтальмологии. – 1980. – № 2. – С. 28-31.

3. Дога А.В., Качалина Г.Ф., Горшков И.М., Куранова О.И. Перспективы применения микроимпульсного лазерного воздействия при макулярном отеке после хирургического удаления эпиретинальной мембраны // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2013. – № 4 (153). – С. 71-74.

4. Дога А.В., Качалина Г.Ф., Педанова Е.К., Буряков Д.А. Субпороговое микроимпульсное лазерное воздействие при лечении диабетического макулярного отека // Современные технологии в офтальмологии. – 2015. – № 1. – С. 58-61.

5. Желтов Г.И. Воздействие интенсивного оптического света на ткани глаз: исследования и приложения: Автореф. дис. ... д-ра физ.-мат. наук. – Минск, 1996. – 92 с.

6. Желтов Г.И., Романов Г.С., Романов О.Г., Иванова Е.В. Селективное действие лазерных импульсов на ретинальный пигментный эпителий. Физические основы // Новое в офтальмологии. – 2012. – № 3. – С. 37-43.

7. Качалина Г.Ф., Павлова Е.С. Субпороговая аргоновая коагуляция сетчатки в лечении очаговой диабетической макулопатии // Офтальмохирургия. – 2004. – № 3. – С. 43-46.

8. Качалина Г.Ф., Педанова Е.К., Соломин В.А., Клепичина О.Б. Морфофункциональные результаты лечения центральной серозной хориоретинопатии в субпороговом микроимпульсном режиме лазерного воздействия длиной волны 577 нм (предварительное сообщение) // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2013. – № 4 (153). – С. 127-130.

9. Краснов М.М., Сапрыкин П.И., Доронин П.П. и др. Электронно-микроскопическое изучение тканей глазного дна при лазерной коагуляции // Вестник офтальмологии. – 1973. – Т. 89, № 2. – С. 13-15.

10. Федорук Н.А., Федоров А.А., Большунов А.В. Патоморфологические и гистохимические проявления взаимодействия лазерного излучения с тканями хориоретинального комплекса (обзор литературы) // Вестник офтальмологии. – 2009. – № 3. – С. 61-64.

11. Ходжаев Н.С., Черных В.В., Роменская И.В. и др. Влияние лазеркоагуляции сетчатки на клинико-лабораторные показатели у пациентов с диабетическим макулярным отеком // Вестник НГУ. – 2011. – Т. 9, № 4. – С. 48-53.

12. Bandello F., Polito A., Del Borrello M. et al. «Light» versus «classic» laser treatment for clinically significant diabetic macular oedema // Br. J. Ophthalmol. – 2005. – Vol. 89, № 7. – P. 864-870.

13. Bok D. The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision // J. Cell. Sci. Suppl. – 1993. – Vol. 17. – P. 189-195.

14. Desmettre T.J., Mordon S.R., Buzawa D.M., Mainster M.A. Micropulse and continuous wave diode retinal photocoagulation:

visible and subvisible lesion parameters // Br. J. Ophthalmol. – 2006. – Vol. 90, № 6. – P. 709-712.

15. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Photocoagulation for diabetic macular edema. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) report No 1 // Arch. Ophthalmol. – 1985. – Vol. 103. – P. 1796-1806.

16. Figueira J., Khan J., Nunes S. et al. Prospective randomised controlled trial comparing sub-threshold micropulse diode laser photocoagulation and conventional green laser for clinically significant diabetic macular oedema // Br. J. Ophthalmol. – 2009. – Vol. 93 (10). – P. 1341-1344.

17. Gao X., Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation // J. Biomed Sci. – 2009. – Vol. 16. – P. 4.

18. Hamann S. Molecular mechanisms of water transport in the eye // Int. Rev. Cyt. – 2002. – Vol. 215. – P. 395-431.

19. Hattenbach L.O., Beck K.F., Pfeilschifter J. et al. Pigment epithelium-derived factor is upregulated in photocoagulated human retinal pigment epithelial cells // Ophthalmic Res. – 2005. – Vol. 37, № 6. – P. 341-346.

20. King G.L., Suzuma K. Pigment-epithelium-derived factor – a key coordinator of retinal neuronal and vascular functions // N. Engl. J. Med. – 2000. – Vol. 342, № 5. – P. 349-351.

21. Lanzetta P., Dorin G., Pirracchio A., Bandello F. Theoretical bases of non-ophthalmoscopically visible endpoint photocoagulation // Semin. Ophthalmol. – 2001. – Vol. 16, № 1. – P. 8-11.

22. Lovestam-Adrian M., Agardh E. Photocoagulation of diabetic macular oedema – complications and visual outcome // Acta Ophthalmol. Scand. – 2000. – Vol. 78. – P. 667-671.

23. Noma H., Funatsu H., Mimura T. Pigment epithelium-derived factor is related to macular microcirculation in patients with macular edema and branch retinal vein occlusion // Int. Ophthalmol. – 2012. – Vol. 32, № 5. – P. 485-489.

24. Ogata N., Ando A., Uyama M., Matsumura M. Expression of cytokines and transcription factors in photocoagulated human retinal pigment epithelial cells // Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. – 2001. – Vol. 239, № 2. – P. 87-95.

25. Schatz H., Madeira D., McDonald H.R., Johnson R.N. Progressive enlargement of laser scars following grid laser photocoagulation for diffuse diabetic macular edema // Arch. Ophthalmol. – 1991. – Vol. 109. – P. 1549-1551.

26. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function // Physiol Rev. – 2005. – Vol. 85. – P. 845-881.

27. Yu A.K., Merrill K.D., Truong S.N., Forward K.M., Morse L.S., Telander D.G. The comparative histologic effects of subthreshold 532- and 810-nm diode micropulse laser on the retina // Inv. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2013. – Vol. 54. – P. 2216-2224.

Поступила 14.07.2015