

Ультраструктурные изменения хориоретинального комплекса при воздействии субпорогового лазерного излучения на длинах волн 0,81 и 0,532 мкм Экспериментальное исследование.



Федорук Н. А.



Федоров А. А.



Большунов А. В.

ул.Россолимо, 11А, Москва, 119021, ФГБУ «НИИ глазных болезней РАМН», Российская Федерация

РЕЗЮМЕ

Офтальмология. — 2014. — Т. 11, № 4. — С. 82–86

Цель: Выявление ультраструктурных изменений в хориоретинальном комплексе (ХРК) и возможности их обратимости при субпороговом воздействии лазерным излучением на длинах волн 532 мкм и 810 мкм через 1, 8 и 30 суток. **Методы:** Экспериментальное исследование проводили на 32 глазах 16 кроликов породы серый шиншилла с использованием лазерного излучения на длинах волн 0.532 мкм и 0.81 мкм в непрерывном, микроимпульсном режимах, а также в режиме транспупиллярной термотерапии. Ультраструктурное исследование участков лазерного воздействия на ретинальную ткань выполняли с помощью трансмиссионного электронного микроскопа EM-10C («Opton», Германия). **Результаты:** Через 1 сутки после воздействия субпороговым лазерным излучением во всех исследуемых группах основные ультраструктурные изменения в ХРК происходили в слоях ретинального пигментного эпителия (РПЭ), хориокапиллярах (ХК) и фоторецепторах. Через 8 суток была отмечена внутриклеточная регенерация клеток РПЭ, а также частичное восстановление ХК кровотока и макрофагальной функции РПЭ. Через 30 суток после воздействия лазерным излучением практически полностью восстанавливалась морфология РПЭ, численность и структура наружных сегментов фоторецепторов на фоне регенерации митохондрий во внутренних сегментах. **Заключение:** Ультраструктурные повреждения ХРК после воздействия субпороговым лазерным излучением носят обратимый характер, и вследствие внутриклеточной регенерации к 30 суткам эксперимента происходит практически полное восстановление их клеточной структуры.

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

Конфликт интересов отсутствует.

Ключевые слова: субпороговое лазерное излучение, хорио-ретинальный комплекс, ретинальный пигментный эпителий, экспериментальное исследование, электронная микроскопия.

ENGLISH

Ultrastructural changes of chorioretinal complex under sub-threshold laser exposure at wavelengths of 0.81 and 0.532 μm (experimental study)

Fedoruk N. A., Fedorov A. A., Bolshunov A. V

Experience Scientific-Research Institute of Eye Diseases of the Russian Academy of Medical Sciences, 11A, Rossolimo street, Moscow, 119021, Russian Federation

SUMMARY

Aim: To reveal ultrastructural changes of chorioretinal complex and their possible reversibility under sub-threshold laser exposure at wavelengths of 0.81 and 0.532 μm in 1, 8 and 30 days. **Methods:** Experimental study was performed on 16 chinchilla rabbits (32 eyes) using laser at wavelengths of 0.532 and 0.81 μm in CW, micropulse, and transpupillary thermotherapy modes. Transmission electron microscope EM-10C (Opton, Oberkochen, Germany) was used to perform

ultrastructural study of retina following laser exposure. Results: In a day after sub-threshold laser exposure, ultrastructural changes were mainly detected in retinal pigment epithelium (RPE), choriocapillaries, and photoreceptors. In 8 days, intracellular regeneration of RPE and partial restoration of choriocapillary blood flow and RPE macrophages were observed. In 30 days, RPE morphology, the number and the structure of photoreceptor outer segments were re-established. Mitochondria of photoreceptor inner segments regenerated as well. Conclusion: Ultrastructural changes of chorioretinal complex following sub-threshold laser radiation were reversible. Intracellular regeneration provided almost complete recovery of chorioretinal complex structure by day 30.

Keywords: sub-threshold laser exposure, experimental study, electron microscopy.

Financial disclosure: Authors has no financial or property interests related to this article. The authors declare that there are no conflicts of interest.

Ophthalmology in Russia. — 2014. — Vol. 11, No 4. — P. 82–86

ВВЕДЕНИЕ.

Метод лазерной фотокоагуляции тканей хориоретинального комплекса при различных заболеваниях заднего отдела глаза широко и успешно используется в офтальмологии уже более 50 лет. Его терапевтическая эффективность не вызывает сомнений. Получение максимального терапевтического эффекта за счет избирательного воздействия на микроструктуры хориоретинального комплекса (ХРК) с минимальными не снижающими зрительных функций повреждениями сенсорной сетчатки является основной целью лазерной коагуляции. Даже локальные деструктивные изменения в хориоретинальном комплексе вследствие лазерной фотокоагуляции могут быть причиной возникновения относительных и абсолютных скотом, прогрессирующей атрофии ретинального пигментного эпителия (РПЭ), суб- и эпиретинального фиброза, формирования ятрогенной субретинальной неоваскулярной мембраны [1-9]. Эти риски приобретают особое значение при использовании метода лазерной фотокоагуляции в лечении макулярной патологии в связи с высокой функциональной значимостью центральной зоны сетчатки. Воздействие в этой области требует использования наиболее щадящих лазерных технологий, сводящих к минимуму осложнения при достаточном терапевтическом эффекте. В настоящее время большинство исследователей склоняются к тому, что для успешного лечения многих заболеваний заднего отдела глаза достаточно воздействовать лишь на РПЭ так называемыми субпороговыми дозами лазерного излучения, практически не вызывающими в нем офтальмоскопически видимых изменений. В этом случае минимальное повреждение РПЭ на субклеточном уровне способствует активации в нем метаболических процессов, внутриклеточной регенерации и восстановлению структурных основ гематоретинального барьера, сохраняя при этом, практически не измененным, состояние прилежащих слоев сенсорной сетчатки и хориокапилляров. [10-14]. В настоящее время в офтальмологической практике применяют ряд субпороговых лазерных технологий, в основе которых лежит селективное воздействие на ткани

ХРК с использованием длин волн излучения видимого и ближнего инфракрасного диапазона, не вызывающих денатурацию белковых структур в зоне лазерного воздействия. Это позволяет избирательно и прецизионно воздействовать на микроструктуры ХРК и, таким образом, уменьшать риск негативного воздействия на сенсорную сетчатку и хориокапиллярный кровоток [11,12,15-18]. Уменьшение повреждающего действия лазерного излучения можно добиться путем снижения его уровня мощности [15], укорочения экспозиции импульса воздействия [19,20] или использования низкой мощности при достаточно длинной экспозиции (1 мин.) [21-24], либо подавая требуемую энергию не за один лазерный импульс, а с использованием пакетов повторяющихся микроимпульсов [25]. Все это позволяет избежать офтальмоскопически видимое повреждение в точке приложения энергии и смежных слоях сетчатки. Считается, что для получения порогового повреждения сетчатки, регистрируемого при ангиографии, мощность должна быть в 2,7 раза ниже, чем для получения офтальмоскопически видимого [26]. При этом на морфологическом уровне при применении субпороговых лазерных технологий происходит селективное повреждение поглощающих структур, которое может ограничиться субклеточным уровнем и выявляться лишь при электронной микроскопии [12, 25]. В соответствии с этим целью нашего исследования было изучение ультраструктурных изменений в тканях хориоретинального комплекса при субпороговом воздействии лазерного излучения на длинах волн 0,532 мкм и 0,810 мкм через 1, 8 и 30 суток, а также их обратимости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Эксперименты проведены на 32 глазах 16 кроликов породы шиншилла серый обоего пола массой 2-2,5 кг. В работе использовали лазерную офтальмологическую установку «Symphony» фирмы IRIDEX (США) на основе двух лазеров: твердотельного ИАГ-лазера с удвоением частоты излучения на длине волны 0,532 мкм, а также диодного лазера с излучением на длине волны 0,81 мкм в непрерывном, микроимпульсном режимах и отдель-

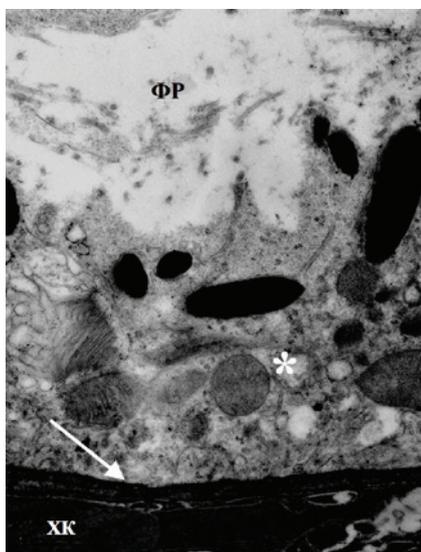


Рис. 1. ХРК через 1 сутки после лазерного воздействия. Тромбоз ХК, гипопигментация РПЭ, деструкция клеточных органелл, в частности, митохондрий (*). Отек в слое ФР. МБр (†) сохранена. Электроннограмма. Ув. x6000.

Fig.1. The chorioretinal interface in 1 day after subthreshold laser application. Thrombosis of choriocapillares, destruction of mitochondria, edema of photoreceptors. EM. Mag.x6000.

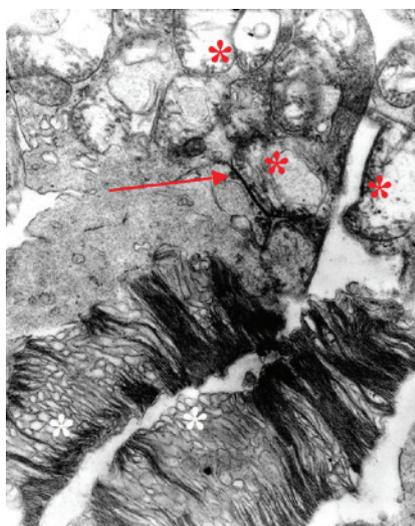


Рис. 2. ФР через 1 сутки после лазерного воздействия. Наружные сегменты ФР (*) отечны и дезорганизованы. Сглаженность или отсутствие крист митохондрий внутренних сегментов (*). ВПМ фрагментирована (†). Электроннограмма. Ув. x8000.

Fig.2. Photoreceptors in 1 day after subthreshold laser application. Outer segments edematous and disorganized. The mitochondrial cristae are smoothed. Outer limiting membrane disrupted. EM. Mag. x8000.

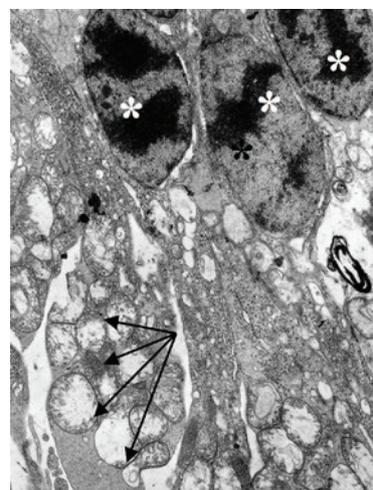


Рис. 3. ХРК через 8 суток после лазерного воздействия. Во внутренних сегментах ФР большинство митохондрий имеют сглаженные кристы или их полное отсутствие (†). Ядра ФР (*) не изменены. Электроннограмма. Ув. x8000.

Fig.3. The chorioretinal interface in 8 day after subthreshold laser application. The most of mitochondrial cristae are smoothed or disappeared. The nuclei of photoreceptors almost not changed. Em. Mag.x8000.

но — в режиме транспупиллярной термотерапии. Лазерное излучение на глазном дне кроликов фокусировали с помощью контактной линзы Гольдмана.

Животные были разделены на 4 группы по 8 кроликов (16 глаз в каждой). Левые глаза всех подопытных животных служили контролем. В 1-ой группе субпороговое воздействие проводили непрерывным излучением диодного лазера на длине волны 0.81 мкм. Предварительно, в зависимости от степени пигментации глазного дна, определяли уровень пороговой мощности излучения (появление очага коагуляции 1 степени по классификации F. L'Esperance) в фокальной плоскости системы наведения щелевой лампы, затем мощность понижали на 30% [15]. Во 2-ой группе проводили субпороговую микроимпульсную лазеркоагуляцию (СМИЛК) излучением диодного лазера на длине волны 0.81 мкм. Предварительно выбирали уровень мощности в непрерывном режиме, необходимом для коагулята 1 степени при экспозиции 0.1 с, затем лазер переключали в микроимпульсный режим с увеличением экспозиции до 0.3 с при той же мощности.

В 3-й группе проводили субпороговое воздействие с использованием непрерывного излучения на длине волны 0.532 мкм. При этом определяли уровень пороговой мощности при экспозиции 0.2 с, затем длительность воздействия уменьшали до 0.1 с [19].

В 4-й группе использовали методику транспупиллярной термотерапии (ТТТ) непрерывным лазер-

ным излучением на длине волны 0.81 мкм при мощности 0,2 Вт, диаметре пятна излучения 3 мм и экспозиции 1 мин [11].

Животных выводили из эксперимента методом воздушной эмболии в ушную вену через 1, 8 и 30 суток. Энуклеированные глаза фиксировали в холодном 2,5% растворе глутаральдегида в течение 2-х часов. Участки сетчатой оболочки (размерами 2×2 мм), подвергшиеся лазерному воздействию, дофиксировали в 1% растворе осмиевой кислоты и заливали в смесь эпоксидных смол эпон-аралдит. Ультраструктурное исследование участков лазерного воздействия в отношении ретинальной ткани выполняли с использованием трансмиссионного электронного микроскопа EM-10С («Opton», Германия) при ускоряющем напряжении 60 кВ. Проведенные исследования были рецензированы и утверждены локальным этическим комитетом института.

РЕЗУЛЬТАТЫ.

Для всех исследованных групп были свойственны, в той или иной степени, характерные ультраструктурные изменения в ХРК. Так, через 1 сутки после воздействия субпороговым лазерным излучением на глазное дно кроликов основные изменения отмечали в слоях РПЭ, хориокапиллярном и фоторецепторном слое (рис. 1). Изменения заключались в локальном тромбозе и непроходимости отдельных ХК в проекции воздействия лазерного излучения, гипопигментации и частичной деструк-

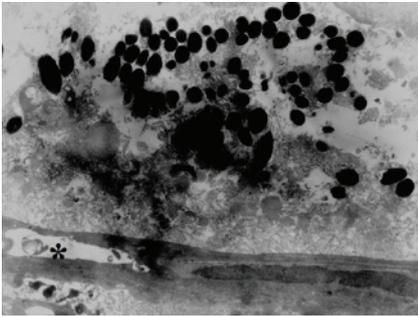


Рис. 4. ХРК через 8 суток после лазерного воздействия. Частичное восстановление ХК кровотока (*), увеличение гранул пигмента в РПЭ в процессе его внутриклеточной регенерации. Электроннограмма. Ув.х5000.

Fig.4. The chorioretinal interface in 8 day after subthreshold laser application. Partial of choriocapillar blood flow. Intracellular regeneration of RPE accompanied by pigment granules increasing. EM. Mag.x5000.

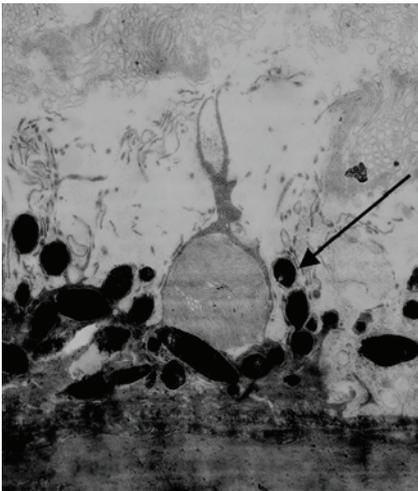


Рис. 5. ХРК через 30 суток после лазерного воздействия. Обычная морфология РПЭ, восстановление его макрофагальной функции (†) и ХК кровотока. Электроннограмма. Ув. х5000.

Fig.5. The chorioretinal interface in 30 day after subthreshold laser application. Restoration of macrophage function of the RPE and choriocapillar blood flow. EM. Mag. x5000.

ции ряда внутриклеточных органелл, особенно митохондрий, в прилежащих клетках РПЭ. При этом апикальная и базальная клеточные мембраны, а также подлежащая мембрана Бруха сохраняли свою непрерывность. Однако признаки отека между РПЭ и слоем фоторецепторов свидетельствовали о повышенной клеточной проницаемости.

Наружные сегменты ФР становились неравномерно отечными, с локально поврежденной наружной мембраной, что позволяло отдельным дискам или их конгломератам выходить в субретиальное пространство. Снижение макрофагальных функций части клеток РПЭ способствовало субретиальному накоплению дисков (рис. 2). Наружная пограничная мембрана сетчатки представляла собой отдельные разрозненные фрагменты различной величины. Основные ультраструктурные изменения отмечены во внутренних сегментах ФР в виде выраженного отека значительной части митохондрий со сглаженностью или полной потерей крист на 8 сутки эксперимента (рис. 3). При этом реснички, связывающие внутренние сегменты ФР с телом клетки, а также сами ядра сохраняли свою ультраструктуру, хотя и приобретали неодинаковую пространственную плотность по протяжению.

На 8 сутки отмечали внутриклеточную регенерацию клеток РПЭ, что проявлялось, прежде всего, в увеличении количества гранул меланина в апикальной цитоплазме клеток — своеобразная компенсаторная гиперплазия в ответ на повреждение органелл воздействием субпороговым лазерным излучением. Наблюдали также частичное восстановление хориокапиллярного кровотока и макрофагальной функции РПЭ в зоне лазерного воздействия. В результате уменьшилось количество тканевого детрита в слое ФР и сближение двух этих слоев (рис. 4).

Через 30 суток после воздействия лазерным излучением в субпороговом режиме ультраструктура РПЭ в зоне воздействия практически полностью восстанавливалась, равно как и его макрофагальная и трофическая функции (рис. 5). Особенно следует подчеркнуть почти завершенную регенерацию митохондрий во внутренних сегментах ФР (рис. 6). В связи с этим восстанавливалась численность и струк-

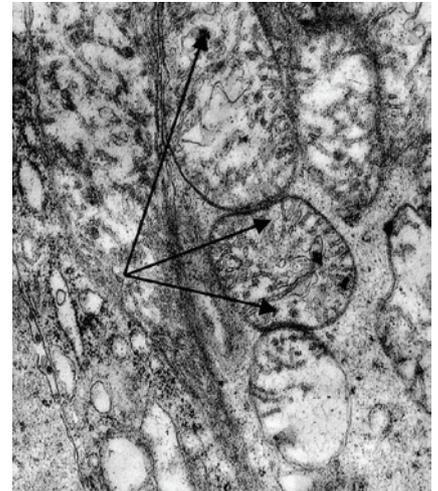


Рис. 6. 30 суток после лазерного воздействия. Практически полное восстановление структуры митохондрий (†) и других органелл во внутреннем сегменте ФР. Электроннограмма. Ув.х8000.

Fig.6. The chorioretinal interface in 30 day after subthreshold laser application. Almost complete recovery of the mitochondrial crista and other organelles in inner photoreceptor segments. EM. Mag.8000.

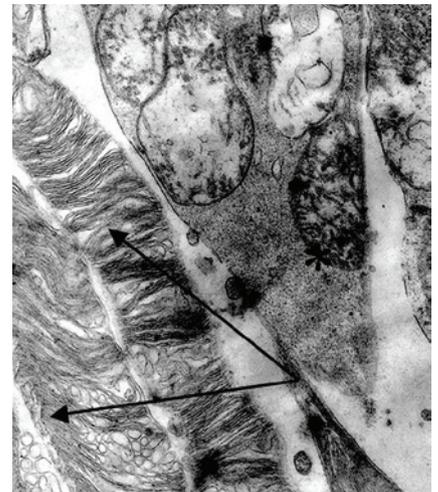


Рис. 7. 30 суток после лазерного воздействия. Неполная дифференцировка регенерирующих внутренних (*) и наружных сегментов ФР (†). Электроннограмма. Ув. х8000.

Fig.7. In 30 day after subthreshold laser application. Incomplete regeneration of some photoreceptor cells. EM. Mag.x8000.

тура наружных сегментов ФР, хотя часть из них не была к этому времени полностью дифференцирована: имели место неравномерный просвет, форма сегментов и расположение дисков внутри них (рис. 7).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Электронно-микроскопический метод исследования позволил расширить представления о степени и уровне изменений в хориоретинальном комплексе экспериментальных животных (кроликов) после воздействия субпороговым лазерным излучением. Главной особенностью такого воздействия следует считать ультраструктурные изменения клеточных мембран и органелл, в основном, митохондрий внутренних сегментов фоторецепторов и РПЭ, ответственных за клеточный метаболизм и процессы световосприятия. Следует отметить, что эти изменения носили обратимый харак-

тер и к 30 суткам эксперимента были практически нивелированы за счет внутриклеточной регенерации, лазериндуцированной ультраструктурной альтерации клеток ХРК. Наиболее полную и раннюю внутриклеточную регенерацию в хориоретинальном комплексе наблюдали после лазерных вмешательств в микроимпульсном режиме и режиме транспупиллярной термотерапии. Полученные данные имеют принципиальное значение для понимания процессов, происходящих на микроуровне, при использовании лазерных технологий в лечении заболеваний макулярной области.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Fine et al. Subretinal neovascularisation developing after prophylactic argon laser photocoagulation of atrophic macular scars. *Amer.J. Ophthalmol.* 1976; 82 (3): 352-357.
2. Han D., Mieler W. Submacular fibrosis after photocoagulation for diabetic macular edema. *Am.J. Ophthalmol.* 1992;113: 513-21.
3. Ishiko S., Ogasawara H. et al. Tye use of scanning laser ophthalmoscope micropertometry to detect visual impairment caused by macular photocoagulation. *Ophthalmic. Surg. Lasers.* 1998; 29: 95-98.
4. Lewen R. Subretinal neovascularization complicating laser photocoagulation of diabetic maculopathy. *Ophthalmic. Surg.* 1988; 19: 734-37.
5. Lewis H, Schachat A. et al. Choroidal neovascularization after laser photocoagulation for diabetic macular edema. *Ophthalmol.* 1990; 97: 503
6. Lovestam-Adrian M., Agardh E. Photocoagulation of diabetic macular oedema – complications and visual outcome. *Act. Ophthalmol. Scand.* 2000;78 (6): 667-671.
7. Mills P. Preretinal macular fibrosis. *Trans.Ophthal.Soc. U. K.* 1980; 99 (1): 50-53.
8. Schatz H., Madeira D. et al. Progressive enlargement of laser scars following grid laser photocoagulation for diffuse diabetic macular edema. *Arch. Ophthalmol.* 1991; 109: 1549-51.
9. Varley M., Frank E. et al. Subretinal neovascularization after focal argon laser for diabetic macular edema. *Ophthalmol.* 1988; 95: 567-73.
10. Brinkmann R., Birngruber R. Selective retina therapy (SRT). *Med. Phys.* 2007;17 (1): 6-22.
11. Mainster M. Decreasing retinal photocoagulation damage: principles and techniques. *Semin. in Ophthalmol.* 1999; 14 (4): 200-9.
12. Roider J., Brinkmann R. et al. Subthreshold (retinal pigment epithelium) photocoagulation in macular diseases: a pilot study. *Br.J. Ophthalmol.* 2000; 84: 40-47.
13. Vujosevic S., Martini F., Convento E. et al. Subthreshold laser therapy for diabetic macular edema: metabolic and safety issues. *Curr Med Chem.* 2013; 20 (26): 3267-71.
14. Mirzabekova K.A. [Clinical and technological features of laser treatment for diabetic retinopathy in ametropia]. *Klinicheskie i tehnologicheskie osobennosti lazernogo lechenija diabeticheskoy retinopatii pri ametropijah: Dis....kand. med. nauk. – M., 2004 (In Russ).*
15. Chen S.N., Hwang J.F. et al. Subthreshold diode micropulse photocoagulation for the treatment of chronic central serous chorioretinopathy with juxtafoveal leakage. *Ophthalmol.* 2008; 115 (12):2229-34.
16. Dorin G. Subthreshold and micropulse diode laser photocoagulation. *Semin. in Ophthalmol.* 2003; 18 (3): 147-153.
17. Elsner H., Porsken E. et al. Selective retina therapy in patients with CSCd. *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2006; 244 (12): 1638-45.
18. Sivaprasad S., Dorin G. Subthreshold diode laser micropulse photocoagulation for the treatment of diabetic macular edema. *Expert Rev Med Devices.* 2012;9 (2): 189-19.
19. Pavlova E.S. [Sub-threshold argon laser photocoagulation of the retina in the treatment of focal and diffuse diabetic maculopathy with nonproliferative diabetic retinopathy]. *Subporogovaja argonovaja lazernaja koaguljacija setchatki v lechenii ochagovoj i diffuznoj diabeticheskoy makulopatii pri neproliferativnoj diabeticheskoy retinopatii: Dis....kand. med. nauk. – M., 2004 (In Russ).*
20. Akduman L., Olk R. Subthreshold modified grid diode laser photocoagulation in diffuse diabetic ocular edema. *Ophthalmic surg. and lasers.* 1999; 30 (9): 706-714.
21. Olk R., Akduman L. Minimal intensity diode laser (810 nanometer) photocoagulation (MIP) for diffuse diabetic macular edema (DDME). *Semin. in Ophthalmol.* 2001; 16 (1): 25-30.
22. Mainster M., Reichel E. Transpupillary thermotherapy for age-related macular degeneration: long-pulse photocoagulation, apoptosis, and heat shock proteins. *Ophthalmic. Surg. Lasers.* 2000; 31: 359-373.
23. Mainster M., Reichel E. Transpupillary thermotherapy for age-related macular degeneration: Principles and techniques. *Semin.Ophthalmol.* 2001; 16 (2): 55-59.
24. Roider J., Michaud N. et al. Microcoagulation of the fundus. Experimental results of repeated laser pulse exposure. *Fortschr Ophthalmol.* 1991; 88 (5): 473-6.
25. Framme C., Alt C. et al. Selective RPE laser treatment with a scanned cw-laser beam in rabbits. *Ophthalmologie.* 2005; 102 (5): 491-6.
26. Oosterhuis J., Journee-de Korver J. et al. Transpupillary thermotherapy in choroidal melanomas. *Arch. Ophthalmol.* 1995; 113: 315-321.
27. Reichel E., Berocal A. et al. Transpupillary thermotherapy of occult subfoveal choroidal neovascularization in patients with age-related macular degeneration. *Ophthalmol.* 1999; 106: 1908-1914.