

УДК 617.735:616–076.4–085.849.19–092.9

### Ультраструктурні зміни сенсорної частини сітківки кролика після застосування субпорогового лазерного випромінювання з довжиною хвилі 532, 577 і 810 нм з використанням міліімпульсного і мікроімпульсного режимів роботи лазера

Т. А. Романова, аспірант

ГУ «Інститут очних захворювань і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України», Одеса (Україна)

E-mail: romanova-work@rambler.ru

**Вступ.** У даній статті вивчалися ультраструктурні зміни сенсорної частини сітківки кролика після субпорогового впливу лазерами з різною довжиною хвилі. На сучасному етапі розвитку офтальмології лазерна коагуляція сітківки залишається «золотим» стандартом лікування судинної патології очного дна. Однак, даний метод має ряд ускладнень, тому є особливо актуальним пошук альтернативних методик нанесення лазерної енергії, які б не мали небажаних побічних ефектів.

**Мета.** Метою роботи було вивчення впливу субпорогової лазерної дії на сенсорну частину сітківки кролика лазерами, генеруючими випромінювання з довжиною хвилі 532 нм, 577 нм і 810 нм з використанням міліімпульсного і мікроімпульсного режимів роботи лазера за даними електронної мікроскопії.

**Матеріали та методи.** Робота виконана на 3 дорослих кроликах (5 очей) породи шиншила, вік 6–7 місяців, масою 2,5–3 кг. Лазерні коагуляти наносилися в нижніх сегментах ока, які були поділені умовно на дві частини для виконання зливної і незливної лазерної коагуляції сітківки, використовувалося лазерне випромінювання з різною довжиною хвилі. Лазерний вплив на сітківку кролика виконувався в двох режимах роботи лазера: в міліімпульсному і мікроімпульсному, використовувалися тільки субпорогові потужності лазерного впливу.

**Результати та їх обговорення.** Електронно — мікроскопічне дослідження показало, що незливний метод нанесення лазерних коагулятів має меншу пошкоджуючу дію на сенсорну частину сітківки кролика, ніж зливний метод нанесення коагулятів. Після дії лазерного випромінювання довжиною хвилі 577 нм в міліімпульсному режимі роботи лазера, при використанні зливного методу нанесення коагулятів на сітківку кролика спостерігаються менші пошкодження, ніж при аналогічній дії лазером довжиною хвилі 532 нм. Але при незливному методі нанесення коагулятів при дії лазером довжиною хвилі 577 нм в міліімпульсному режимі в сенсорній частині сітківки спостерігаються менші пошкоджуючі зміни. Виявляється збереженість зовнішніх та внутрішніх сегментів фоторецепторних клітин. Електронно — мікроскопічне дослідження продемонструвало, що після лазерного впливу довжиною хвилі 810 нм в мікроімпульсному режимі роботи лазера, при незливному методі нанесення коагулятів на сітківку кролика спостерігається найменше пошкодження сенсорній частині сітківки, ніж при аналогічних впливах лазерами довжиною хвилі 532 нм та 577 нм.

**Висновки.** Встановлено, що найменшу пошкоджуючу дію на сенсорну частину сітківки кролика має випромінювання довжиною хвилі 810 нм. Зміни мюллеровських клітин спостерігались майже після всіх лазерних впливів на сітківку кролика.

**Ключові слова:** ультраструктурні зміни сенсорного шару сітківки кролика, субпороговий лазерний вплив.

**Ключевые слова:** ультраструктурные изменения сенсорного слоя сетчатки кролика, субпороговое лазерное воздействие.

## Ultrastructural changes of the retinal neuroepithelium of rabbits after subthreshold laser influence by laser generating radiation with the wavelength of 532 nm, 577 nm and 810 nm with application of millipulse and micropulse operating conditions of the laser

Romanova T. A.

State Institution The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of the NAMS of Ukraine; Odessa, (Ukraine)

**Introduction.** This article studied the ultrastructural changes of rabbit retinal neuroepithelial after subthreshold exposure lasers of different wavelengths. At the present stage of development of ophthalmology retinal laser photocoagulation remains the «gold» standard of care for retinal vascular disease. However, this method has a number of complications, so is especially urgent search for alternative methods of application of laser energy, which would not have undesirable side effects.

**Purpose.** The aim was to study the effect of subthreshold laser effects on rabbit retinal neuroepithelial lasers generating radiation with a wavelength of 532 nm, 577 nm and 810 nm using millipulse and micropulse laser modes by electron microscopy.

**Methods.** Work performed on the 3rd adult rabbits (5 eyes) Chinchilla, age 6–7 months, weighing 2.5–3kg. Laser scars apply in the lower segments of the eyes, which were divided arbitrarily into two parts to perform the confluent and not confluent laser photocoagulation, using laser radiation of different wavelengths. Laser effect on the rabbit retina was carried out in two modes of operation of the laser: in millipulse and micropulse, used only subthreshold power laser exposure.

**Results.** Electron microscopy examination showed that the not confluent laser photocoagulation has less damaging effect on the rabbit retinal neuroepithelial than the confluent laser photocoagulation. The confluent laser burns 577 nm optical radiation in millipulse laser mode on the rabbit retina are observed less damage than when a similar influence of the laser wavelength of 532 nm. However, if you do not confluent laser burns the method of application of burns when exposed to a laser wavelength of 577 nm in millipulse mode of the neuroepithelial is far less damaging changes. There is preservation of the outer and inner segments of photoreceptor cells. Electron microscopy examination showed that after exposure to the laser wavelength of 810 nm micropulse mode laser, with no confluent method of application of burns on the retina of the rabbit observed the least damage to the neuroepithelial than in similar influence of the laser wavelength of 532 nm and 577 nm.

**Conclusion.** Found that the least damaging effect on the rabbit neuroepithelial has radiation with a wavelength of 810 nm. Changes in Muller cells were observed after almost all laser effects on rabbit retina.

**Key words:** ultrastructural changes of rabbit retinal neuroepithelium, subthreshold laser action.

**Введение.** На современном этапе развития офтальмологии лазерная коагуляция сетчатки остается «золотым» стандартом лечения сосудистой патологии глазного дна. Эффективность данного метода лечения подтверждена рядом крупномасштабных исследований, таких как Early Treatment Diabetic Retinopathy Research Study Group [2], Branch Vein Occlusion Study Group [1]. Несмотря на успешное применение данного метода лечения он, как и большинство других методов, имеет ряд недостатков. Так, трудность дозирования лазерной энергии на измененные ткани сетчатой оболочки приводит в последующем к нежелательным изменениям хориоидеи, пигментного эпителия и сенсорного слоя сетчатой оболочки.

Некоторые исследователи показали, что обычная пороговая лазерная коагуляция сетчатки по типу «решетка» при лечении отека макулы может в

отдаленном периоде сопровождаться рядом осложнений, связанных с «ползучей» атрофией пигментного эпителия вокруг лазерных прижогов [1, 8, 9], хориоидальной неоваскуляризацией [6, 7], субретинальным фиброзом [3, 4] и ухудшением контрастной чувствительности сетчатой оболочки [5, 10]. Некоторыми авторами было предложено нивелировать вышеперечисленные повреждения путем уменьшения длительности лазерного воздействия на ткани сетчатой оболочки, применяя клинически невидимые лазерные прижоги. Поэтому ведется поиск альтернативных методик дозирования лазерной энергии, а также поиск оптимальных схем нанесения лазерных прижогов на пораженную область сетчатки.

**Цель.** Изучить влияние субпорогового лазерного излучения на сенсорную часть сетчатки кролика лазерами с длиной волны 532, 577 и 810 нм с исполь-

зованием миллиимпульсного и микроимпульсного режимов работы лазера по данным электронной микроскопии.

**Материал и методы**

Работа выполнена на 3 взрослых кроликах (5 глаз) породы шиншилла, возраст 6–7 месяцев, массой 2,5–3 кг. Лазерные прижоги наносились в нижних сегментах глаза, которые были поделены условно на две части для выполнения сливной и несливной лазерной коагуляции сетчатки, использовалось лазерное излучение с разной длиной волны (табл. 1.). Лазерное воздействие на сетчатку кролика выполнялось в двух режимах работы лазера: в миллиимпульсном и микроимпульсном, использовались только субпороговые мощности лазерного воздействия. Мощность лазерного воздействия подбиралась для миллиимпульсного режима работы лазера следующим образом: сначала наносился видимый коагулят белого цвета 1–2 степени, затем мощность уменьшалась в два раза по сравнению с тестовым видимым воздействием. При использовании микроимпульсного режима мощность для видимого лазерного прижога подбиралась в миллиимпульсном режиме работы лазера до появления коагулята белого цвета 1–2 степени, затем режим работы лазера переключался в микроимпульсный, и мощность увеличивалась в два раза. Параметры используемого лазерного воздействия представлены в таблице 2.

Забор материала производился через 24 часа после выполнения лазерного воздействия на сетчатку кролика. Эвтаназия животных осуществлялась в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных (86/609 ЕЕС).

Для электронно-микроскопического исследования образцы ткани фиксировались в 2,5 % растворе глутаральдегида на фосфатном буфере при значении pH — 7,4 с последующей дофиксацией 1 % раствором осмиевой кислоты при том же pH буферного раствора. Затем образцы обезвоживали в спиртах восходящей концентрации. Пропитывание материала и его заключение производилось в смеси эпон-аралдит. Ультратонкие срезы окрашивались растворами уранилацетата и цитрата свинца. Срезы просматривались и фотографировались под электронным микроскопом ПЭМ-100–01.

**Результаты и их обсуждение**

Электронно-микроскопическое исследование показало, что после лазерного воздействия длиной волны 532 нм в миллиимпульсном режиме работы лазера, при сливном методе нанесения лазерных прижогов на сетчатку кролика, наблюдается отёк интеррецепторного матрикса. В различных участ-

**Таблица 2.** Параметры лазерного воздействия

Длина волны (нм)	Диаметр пятна (мкм)	Экспозиция (мс)	Сквандность (мс)	Мощность (мВт)	Рабочий цикл (%)
532	100	10	100	30	–
810	100	10	100	60	–
810	200	200	200	440	15
577	200	200	200	120	15
577	100	10	100	50	

ках фоторецепторных клеток от наружных и внутренних сегментов до центральных участков цитоплазмы обнаружены электронно-прозрачные очаги (Рис. 1), ядра фоторецепторных клеток окружены отёчной цитоплазмой, но сохраняют свою структуру. В слое биполярных клеток часть клеточных элементов имеет признаки внутриклеточного отёка. В то же время цитоплазма и ядра мюллеровских клеток выглядят нормальными. В области ганглиозных клеток наблюдаются элементы гидропических изменений цитоплазмы мюллеровских клеток.

При несливном методе нанесения прижогов наблюдается частичная фрагментация наружных сегментов фоторецепторных клеток.

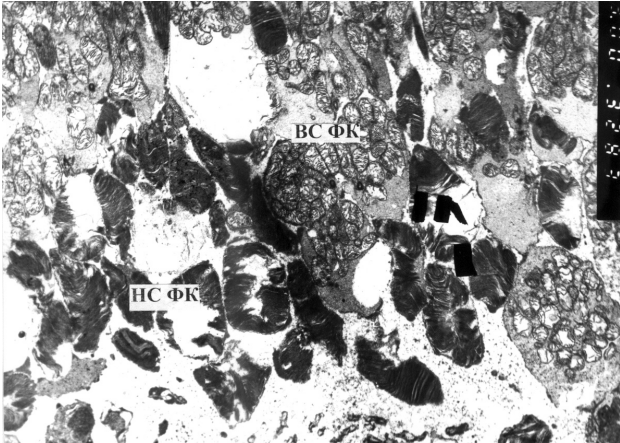
Во внутренних сегментах фоторецепторных клеток наблюдается набухание митохондрий. Ядерная область фоторецепторных клеток сохранена. Клеточные элементы внутренних отделов сетчатки без выраженных изменений, исключая отростки мюллеровских клеток, которые отличаются признаками гидропических изменений.

Вышеописанные изменения свидетельствуют о том, что несливной метод нанесения прижогов имеет менее повреждающее действие на сенсорный слой сетчатки кролика, чем сливной метод нанесения прижогов.

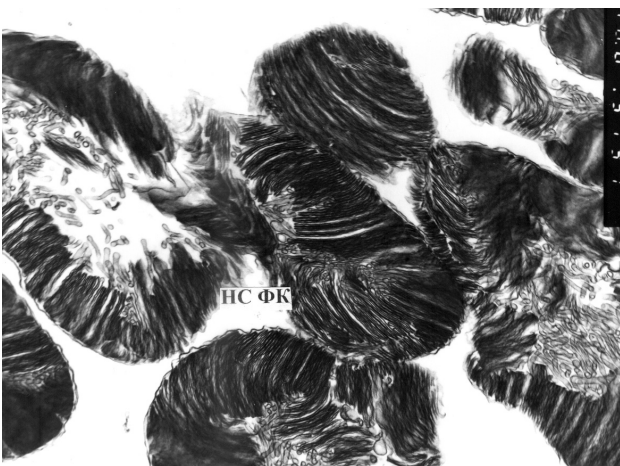
Электронно-микроскопическое исследование показало, что после лазерного воздействия длиной волны 577 нм в миллиимпульсном режиме работы лазера, при сливном методе нанесения прижогов на сетчатку кролика наблюдаются меньшие повреждения, чем при аналогичном воздействии лазером длиной волны 532 нм. При этом наблюдается частичная фрагментация наружных сегментов фото-

**Таблица 1.** Распределение зон лазерного воздействия

№ кролика, глаза	Сегмент глаза	Метод нанесения лазерных прижогов	Режим работы лазера	Длина волны
1. Левый глаз	Нижне-внутренний	Сливной	Миллиимпульсный	532 нм
2. Правый глаз	Нижне-наружный	Сливной	Микроимпульсный	577 нм
2. Правый глаз	Нижне-внутренний	Несливной	Микроимпульсный	577 нм
2. Левый глаз	Нижне-наружный	Несливной	Микроимпульсный	810 нм
2. Левый глаз	Нижне-внутренний	Сливной	Микроимпульсный	810 нм
3. Правый глаз	Нижне-наружный	Несливной	Миллиимпульсный	532 нм
3. Правый глаз	Нижне-внутренний	Несливной	Миллиимпульсный	577 нм
3. Левый глаз	Нижний сегмент	Несливной	Миллиимпульсный	810 нм



**Рис. 1.** Лазерное излучение длиной волны 532 нм, сливной характер коагулятов, воздействие субпороговое. Фрагментирование и образование электронно-прозрачных полостей в ФК. Электронная микрофотография x 3000. Условные обозначения: НС ФК — наружные сегменты фоторецепторных клеток, ВС ФК — внутренние сегменты фоторецепторных клеток.



**Рис. 2.** Лазерное излучение длиной волны 577, сливной характер коагулятов, воздействие субпороговое. Патологические изменения дисков НС ФК. Электронная микрофотография. x 10000. Условные обозначения: НС ФК — внутренние сегменты фоторецепторных клеток.

рецепторных клеток, они гомогенизированы или подвергаются деструкции с образованием везикулярных элементов (Рис. 2).

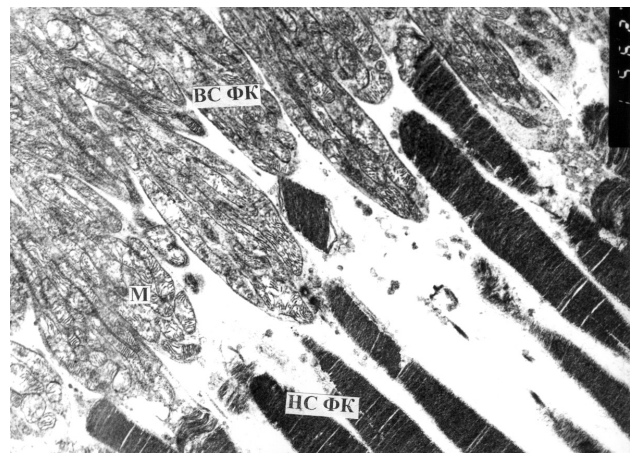
Во внутренних сегментах фоторецепторных клеток отмечается набухание митохондрий. Наблюдаются признаки отека интеррецепторного матрикса, включая участки между наружными и внутренними сегментами фоторецепторных клеток. На отдельных участках виден отек, распространяющийся до наружной пограничной мембраны, а местами включая области ядер фоторецепторных клеток. Рядом такие же структуры без изменений. Нейроны внутренних слоев сетчатки близки по ультраструк-

туре к нормальным. Отличается лишь цитоплазма отростков мюллеровских клеток, которая в слое ганглиозных клеток имеет гидропические изменения.

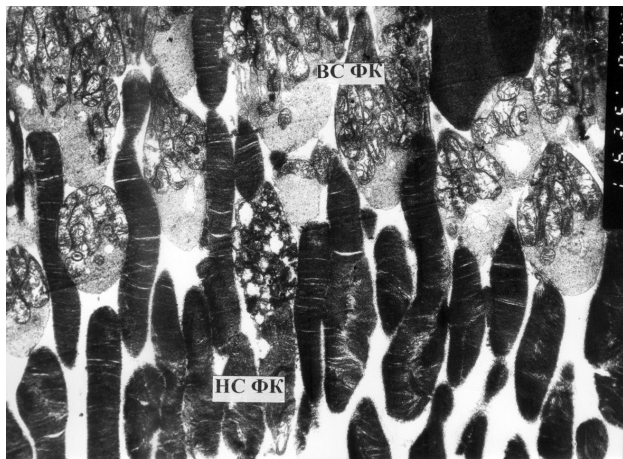
Однако при несливном методе нанесения прижогов при воздействии лазером длиной волны 577 нм в миллиимпульсном режиме в сенсорном слое сетчатки наблюдаются менее повреждающие изменения. Отмечается сохранность наружных и внутренних сегментов фоторецепторных клеток: наружные сегменты с уплотнёнными дисками, а внутренние сегменты отличаются, в основном, набуханием митохондрий (Рис. 3).

Ядра фоторецепторных клеток мало изменены, они окружены отёчными отростками мюллеровских клеток. Клетки биполярного слоя, в большинстве, сохраняют свою структуру, однако часть имеет признаки внутриклеточного отёка. Ядро и цитоплазма мюллеровских клеток в этой области близки по структуре к нормальным. Ганглиозные клетки отличаются электронно-плотным матриксом. Отростки мюллеровских клеток, окружающие такие ганглиозные клетки, также уплотнены и вакуолизированы.

Электронно-микроскопическое исследование показало, что после лазерного воздействия длиной волны 577 нм в микроимпульсном режиме работы лазера, при несливном методе нанесения прижогов на сетчатку кролика наблюдаются меньшие повреждения, чем при сливном нанесении лазером в аналогичном режиме. При этом лазерном воздействии в сенсорном слое сетчатки сохраняется связь апикальных микровилл пигментного эпителия сетчатки с наружными сегментами фоторецепторных



**Рис. 3.** Лазерное излучение длиной волны 577, сливной характер коагулятов, воздействие субпороговое. Уплотненная ультраструктура НС и набухание митохондрий во ВС ФК. Электронная микрофотография. x 4000. Условные обозначения: НС ФК — наружные сегменты фоторецепторных клеток, ВС ФК — внутренние сегменты фоторецепторных клеток, М — митохондрии.



**Рис. 4.** Лазерное излучение длиной волны 577, сливной характер коагулятов, воздействие субпороговое. Ультраструктура НС ФК повышенной электронной плотности; вакуолизация митохондрий внутренних сегментов фоторецепторных клеток, межклеточный отек. Электронная микрофотография.  $\times 3000$ . Условные обозначения: НС ФК — наружные сегменты фоторецепторных клеток, ВС ФК — внутренние сегменты фоторецепторных клеток.

клеток, однако наблюдается повышенная осмиофильность наружных сегментов фоторецепторных клеток. Внутренние сегменты фоторецепторных клеток частично опустошены, митохондрии большей частью вакуолизированы (Рис. 4).

Ядра фоторецепторных клеток частично сохраняют свою структуру, часть же ядер окружены перинуклеарным отеком, встречаются осмиофильные сморщенные ядра. Отростки мюллеровских клеток, в этой зоне, повышенной электронной плотности. В слое биполярных клеток часть нейронов с элементами отека. Цитоплазма мюллеровских клеток уплотнена. Ганглиозные клетки по структуре близки к нормальным. Окружающие отростки мюллеровских клеток имеют признаки гидропических изменений.

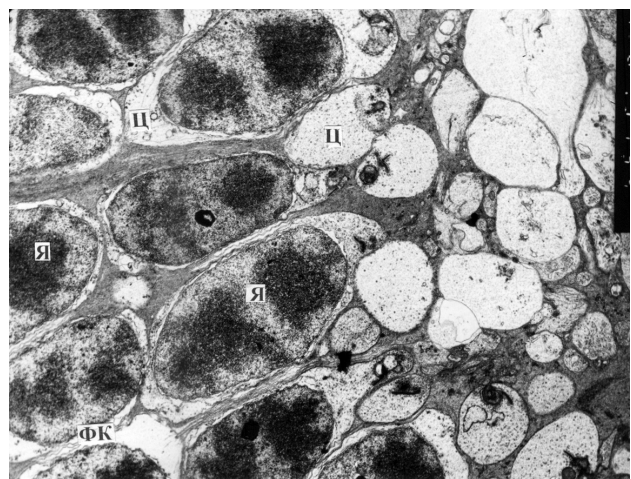
Электронно-микроскопическое исследование показало, что после лазерного воздействия длиной волны 810 нм в миллиимпульсном режиме работы лазера, при несливном методе нанесения прижогов на сетчатку кролика наблюдаются меньшие повреждения, чем после аналогичных воздействий лазеров длиной волны 532 нм и 577 нм. После этого воздействия наблюдается отек интеррецепторного матрикса. Местами он распространяется до наружной пограничной мембраны. В наружных сегментах фоторецепторных клеток отмечается дезорганизация дисков с образованием везикулярных структур. Во внутренних сегментах фоторецепторных клеток наблюдается вакуолизация митохондрий. Гидропические изменения наблюдаются также в центральных отделах цитоплазмы фоторецепторных клеток. Ядра фоторецепторных клеток, в основном, в

хорошем состоянии, хотя встречаются отдельные ядра с повышенной осмиофильностью и плотностью ядерного хроматина. Отростки мюллеровских клеток сохранены. Нейроны внутренних слоев сетчатки по структуре большей частью близки к нормальным.

Электронно-микроскопическое исследование продемонстрировало, что после лазерного воздействия длиной волны 810 нм в микроимпульсном режиме работы лазера, при несливном методе нанесения прижогов на сетчатку кролика наблюдаются меньшие повреждения сенсорного слоя сетчатки, чем при аналогичных воздействиях лазерами длиной волны 532 нм и 577 нм. При этом в сенсорном слое сетчатки были обнаружены элементы дезорганизации дисков в наружных сегментах фоторецепторных клеток, а во внутренних сегментах признаки набухания митохондрий. В отдельных фоторецепторных клетках наблюдался отек центральной области цитоплазмы. Ядра фоторецепторных клеток, в общем, были без особых изменений (Рис. 5). Нейроны внутренних слоев сетчатки и мюллеровских клеток по структуре были близки к нормальным.

**Выводы**

1. Сливной метод нанесения лазерных прижогов носит наиболее повреждающий характер на структуры сенсорного слоя сетчатки кролика при применении всех режимов лазерного воздействия при использовании лазеров длиной волны 532 нм, 577 нм и 810 нм.
2. Наименьшим повреждающим режимом лазерного воздействия оказался микроимпульсный режим работы лазера.



**Рис. 5.** Лазерное излучение длиной волны 810 нм, субпороговое. Периферия очага воздействия. Нормальная ультраструктура ядер ФК. Электронная микрофотография  $\times 4000$ .

Условные обозначения: Я — ядро, Ц — цитоплазма, ФК — фоторецепторная клетка.

3. Наименьшим повреждающим действием на сенсорный слой сетчатки кролика обладает лазерное излучение длинной волны 810 нм.

4. Изменения мюллеровских клеток наблюдаются после применения всех лазерных воздействий.

### *Литература*

1. Branch Vein Occlusion Study Group. Argon laser photocoagulation for macular edema in branch vein occlusion // *Am J Ophthalmol.* — 1984. — Vol. 98. — P. 271–282.
2. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Focal photocoagulation treatment of diabetic macular edema (Relationship of treatment effect to fluorescein angiographic and other retinal characteristics at baseline: ETDRS report no 19) // *Arch Ophthalmol.* — 1995. — Vol. 113. — P. 1144–1155.
3. **Guyer D. R.** Subretinal fibrosis after laser photocoagulation for diabetic macular edema / D. R. Guyer, D. J. D'Amico, C. W Smith // *Am J Ophthalmol.* — 1992. — Vol. 113. — P. 652–656.
4. **Han D. P.** Submacular fibrosis after photocoagulation for diabetic macular edema / D. P. Han, W. F. Mieler, T. C. Burton // *Am J Ophthalmol.* — 1992. — Vol. 113. — P. 513–521.
5. **Ishiko S.** The use of scanning laser ophthalmoscope microperimetry to detect visual impairment caused by macular photocoagulation / S. Ishiko, H. Ogasawara, A. Yoshida, et. al. // *Ophthalmic Surg Lasers.* — 1998. — Vol. 29. — P. 95–98.
6. **Lewen RM.** Subretinal neovascularization complicating laser photocoagulation of diabetic maculopathy // *Ophthalmic Surg.* — 1988. — Vol. 19. — P. 734–737.
7. **Lewis H.** Choroidal neovascularization after laser photocoagulation for diabetic macular edema / H. Lewis, A. P. Schachat, M. H. Haimann, et al. // *Ophthalmology.* — 1990. — Vol. 97. — P. 503–510.
8. **Morgan C. M.** Atrophic creep of the retinal pigment epithelium after focal macular photocoagulation / C. M. Morgan, H. Schatz // *Ophthalmology.* — 1989. — Vol. 96. — P. 96–103.
9. **Schatz H.** Progressive enlargement of laser scars following grid laser photocoagulation for diffuse diabetic macular edema / H. Schatz, D. Madeira, H. R. McDonald, Johnson et. al. // *Arch Ophthalmol.* — 1991. — Vol. 109. — P. 1549–1551.
10. **Sinclair S. H.** Laser treatment of diabetic macular edema: comparison of ETDRS-level treatment with threshold-level treatment by using high-contrast discriminant central visual field testing / S. H. Sinclair, R. Alaniz, P. Presti // *Semin Ophthalmol.* — 1999. — Vol. 14. — P. 214–222.

*Поступила 19.08.2014*