

На правах рукописи

**ФЕДОРУК Наталья Анатольевна**

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ  
ВОЗДЕЙСТВИЯ СУБПОРОГОВОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА  
СТРУКТУРЫ ХОРИОРЕТИНАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА**

**(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

14.01.07 – Глазные болезни

**Автореферат**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва  
2011

Диссертационная работа выполнена в Учреждении Российской академии медицинских наук Научно-исследовательском институте глазных болезней РАМН.

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, профессор      Большунов Андрей Валентинович

кандидат медицинских наук              Федоров Анатолий Александрович

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор      Луцевич Екатерина Эммануиловна

доктор медицинских наук, профессор      Корниловский Игорь Михайлович

**Ведущая организация:** Московский Научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца

Защита состоится «31» октября 2011 г. в \_\_\_\_\_ на заседании диссертационного совета Д 001.040.01 при Учреждении Российской академии медицинских наук Научно-исследовательском институте глазных болезней РАМН по адресу: 119021, г. Москва, ул. Россолимо, 11а,б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИГБ РАМН.

Автореферат разослан «    » сентября 2011 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор медицинских наук

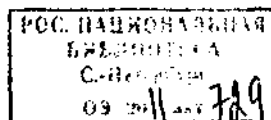
Иванов М.Н.

2011А  
18221

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Терапевтическая эффективность метода лазерной фотокоагуляции тканей хориоретинального комплекса (ХРК) при различных заболеваниях заднего отдела глаза не вызывает сомнений. Метод широко и успешно используется в офтальмологии уже более 50 лет. В настоящее время для коагуляции тканей глазного дна применяются источники лазерного излучения, отличающиеся как спектральным составом, так и режимами генерации (Mainster M. 2000, Rogers A. с соавт. 2001, Dorin G. 2003, Павлова Е.С. 2004, Elsner H. с соавт. 2006). При этом основной задачей лазерной коагуляции является достижение максимального терапевтического эффекта при минимальном повреждении сенсорной сетчатки, т.е. избирательное воздействие на структуры ХРК. Однако, лечебное действие лазерного излучения обычно связано с локальными деструктивными изменениями в ХРК, которые могут быть причиной возникновения относительных и абсолютных скотом, прогрессирующей атрофии РПЭ, суб- и эпиретинального фиброза, формирования ятрогенной субретинальной неоваскулярной мембраны (Lewis H. с соавт. 1990, Schatz H. с соавт. 1991, Nam D. с соавт. 1992, Ishiko S. с соавт. 1998). Многочисленными морфологическими и цитохимическими исследованиями было показано, что для выполнения избирательного лазерного воздействия существенное значение имеет степень абсорбции лазерного излучения различного спектрального состава пигментсодержащими структурами тканей ХРК. При этом с увеличением длины волны лазерного излучения уменьшалось повреждающее действие на сенсорную сетчатку (Brooks H. с соавт. 1989, Nam W. с соавт. 1980, Mainster M. 1999). Однако ряд авторов, изучая структурные изменения тканей ХРК при воздействии лазерным излучением различного спектрального состава, установили, что минимальное повреждение наружных слоев сетчатки и сохранение внутренних слоев сетчатки зависит не только от длины волны лазерного излучения, но и от



уровня используемой для коагуляции мощности (Большунов А.В. с соавт. 1988, Kusaka K. с соавт. 1994, Lanzetta P. с соавт. 2005). Таким образом, важнейшими аспектами избирательного лазерного воздействия на сетчатку являются уровень энергетических параметров лазерного излучения и его спектральный состав.

В настоящее время разработаны так называемые субпороговые лазерные технологии, в основе которых лежит селективное воздействие на ткани ХРК с использованием излучения видимого и ближнего инфракрасного диапазонов длин волн. Особенно это имеет значение при лазерном лечении макулярной патологии в связи с высокой функциональной значимостью желтого пятна. Было доказано, что офтальмоскопически видимые лазерные ожоги не являются показателем достижения желаемого терапевтического эффекта (Brinkmann R. с соавт. 2007, Framme C. с соавт. 2007, Lanzetta P. с соавт. 2001, Roider J. с соавт. 2001, Yoshimura N. с соавт. 1995). По мнению ряда авторов, для этого достаточно воздействовать только на клетки ретинального пигментного эпителия (РПЭ), сохраняя при этом сенсорную сетчатку и хориокапилляры (ХК). К субпороговым лазерным технологиям относятся воздействие лазерным излучением видимого (0.532 мкм) и инфракрасного (0.81 мкм) диапазонов длин волн в непрерывном и микроимпульсном режимах, а также в режиме транспупиллярной термотерапии (ТТТ). В основе перечисленных технологий лежит селективное воздействие на микроструктуры ХРК. Это позволяет избежать необратимых изменений в смежных с точкой приложения энергии слоях. С целью повышения избирательности лазерного воздействия на ХРК и уменьшения повреждающего действия на прилежащие структуры сетчатки уменьшают уровень мощности лазерного излучения (Мирзабекова К.А. 2004) или экспозицию импульса (Akduman L. с соавт. 1999), воздействуют низкой мощностью при достаточно длинной экспозиции (1 мин.) (Oosterhuis J. 1995, Mainster M. 1999, Reichel E. 1999), а также подают требуемую энергию в виде пакетов повторяющихся микроимпульсов (Roider J. с соавт. 1991),

селективно воздействуя на поглощающие структуры. При этом офтальмоскопически видимого повреждения в точке приложения энергии и смежных слоях сетчатки не наблюдается. Морфологические изменения в тканях ХРК при использовании субпороговых лазерных технологий могут ограничиваться субклеточным уровнем и выявляться лишь при электронной микроскопии (Roeder J. с соавт. 1991, Framme C. с соавт. 2002). Изучению морфологических изменений ХРК при воздействии лазерного излучения различных длин волн в субпороговых режимах посвящены отдельные работы (Conolli B. с соавт. 2003, Framme C. с соавт. 2007, Ming Y. с соавт. 2004, Pollak J. 1998, Roeder J. 1992). Авторы выявили, что воздействие лазерным излучением в субпороговых режимах на ткани ХРК вызывает гетерогенные морфологические изменения на уровне РПЭ, фоторецепторного (ФР) и наружного ядерного слоев (НЯС) с последующим восстановлением нормальной архитектуры к концу 6 недели. При ТТТ повреждение сенсорной сетчатки РПЭ отмечается только в случаях воздействия высокими уровнями мощности. К настоящему времени накоплен определенный клинический опыт использования непрерывного лазерного излучения на длинах волн 0,532 мкм и 0,81 мкм на структуры ХРК в субпороговых режимах, однако, данные морфологического исследования структур ХРК при этих видах воздействия отсутствуют (Павлова Е.С. 2004, Мирзабекова К.А. 2004, Akduman L. 1999).

Одним из маркеров функционального и структурного повреждения на субклеточном уровне при различных воздействиях, в том числе и при воздействии лазерным излучением, является нарушение оптимального уровня трансмембранной ионной асимметрии ионов кальция в клетке (Сухоруков В.С. 2002, Trump B. 1989). Ион кальция  $Ca^{2+}$  является одним из ключевых элементов сложной системы внутриклеточного метаболизма нервных и глиальных клеток и наряду с циклическими аденозинмонофосфатом (цАМФ) и гуанозинмонофосфатом (цГМФ) участвует в процессе синаптической передачи, регуляции ионной

проницаемости и возбудимости плазматической мембраны, механизмах нейрональной пластичности, окислительного фосфорилирования (Федоров Н.А. 1979, Rasmussen H. с соавт. 1979). В основе функционирования фоторецепторных клеток сетчатки также лежат ионные перемещения в наружных и внутренних сегментах. В механизме возбуждения фоторецепторов функцию медиатора, обеспечивающего передачу сигнала, выполняет ион кальция. Концентрация кальция в цитозоле клетки регулируется за счет одновременной энергозависимой работы  $Ca^{2+}$ -транспортирующих систем плазматической мембраны, эндоплазматического ретикулума и митохондрий (Караджов Ю.С. 1987, Cohen B. 2001, De Vivo D. 1993, Scheffler I. 2001). Связывание излишков кальция из цитозоля осуществляется митохондриями, что является одной из специализированных функций данных органелл (Carafoli E. 1987, Дадали Л. 1996, Сухоруков В.С. 2002). Также митохондрии служат основным источником внутриклеточной энергии, так как именно в них протекает процесс окислительного фосфорилирования (Scheffler I. 2001). Биохимическими исследованиями было показано выраженное влияние лазерного излучения различного спектрального состава на окислительно-восстановительный потенциал клетки, т.е. на выработку конечного продукта биоэнергетических реакций аденозинтрифосфата (АТФ) (Богуш Л.А. 1981). Существует также мнение, что при воздействии на митохондрии лазерное излучение вызывает в них первичное повреждение из-за абсорбции видимого света дыхательными ферментами. Экспериментальные исследования выявили, что лазерное воздействие вызывает альтерацию митохондрий облученного нейрона и высвобождение из них ионов  $Ca^{2+}$ , повышение концентрации которых и приводит к торможению импульсной активности в клетках (Rounds D. 1968, Узденский А.Б. 1980). Таким образом, как повреждение клеточных мембран, так и деэнергизация митохондрий при действии различных повреждающих факторов оказывают влияние на распределение кальция в клетке. В результате чего в цитозоле клетки происходит накопление внутриклеточного

ионизированного кальция за счет выхода из поврежденных митохондрий и усиленного входа в цитоплазму клеток из экстрацеллюлярного матрикса, который связывается с внутриклеточными буферными системами, образуя в цитоплазме включения солей кальция, выявляемые гистохимическим методом. Учитывая вышесказанное, существует необходимость дальнейшего изучения состояния тканей ХРК после воздействия лазерным излучением в различных субпороговых режимах как на клеточном, так и на субклеточном уровнях.

**Цель исследования:** изучение морфологических и гистохимических изменений в структурах хориоретинального комплекса при субпороговых лазерных вмешательствах.

#### **Задачи исследования**

1. Провести экспериментально-морфологическое изучение воздействия непрерывного лазерного излучения на длине волны 0,81 мкм в субпороговом режиме на микроструктуры ХРК.
2. Провести экспериментально-морфологическое изучение воздействия лазерного излучения на длине волны 0,81 мкм в субпороговом микроимпульсном режиме на микроструктуры ХРК.
3. Провести экспериментально-морфологическое изучение воздействия лазерного излучения на длине волны 0,81 мкм в режиме транспупиллярной термотерапии на микроструктуры ХРК.
4. Провести экспериментально-морфологическое изучение воздействия непрерывного лазерного излучения на длине волны 0,532 мкм в субпороговом режиме на микроструктуры ХРК.
5. Провести сравнительное экспериментально-морфологическое исследование влияния лазерного излучения на длинах волн 0,81 мкм и 0,532 мкм на микроструктуры ХРК в субпороговых режимах.

6. Провести гистохимическое исследование тканей ХРК после воздействия лазерного излучения на длинах волн 0,81 мкм и 0,532 мкм в субпороговых режимах.

#### **Научная новизна**

1. Впервые на глазах экспериментальных (32 кролика, 64 глаза) животных проведено морфологическое и гистохимическое изучение воздействия лазерного излучения на длинах волн 0,81 мкм и 0,532 мкм на ткани хориоретинального комплекса с использованием различных видов субпороговых технологий.
2. Выявлены особенности морфологических изменений структур хориоретинального комплекса при различных видах субпороговых лазерных вмешательств.
3. Впервые на гистохимическом уровне проанализирована динамика накопления внутриклеточного иона кальция  $Ca^{2+}$  в сенсорной сетчатке как маркера клеточного повреждения при воздействии субпороговым лазерным излучением на структуры хориоретинального комплекса.
4. Выявлен обратимый характер морфологических и гистохимических изменений в структурах хориоретинального комплекса при воздействии субпороговым лазерным излучением.

#### **Практическая значимость**

1. Учет морфологических и гистохимических изменений в структурах хориоретинального комплекса при воздействии субпорогового лазерного излучения позволит осуществлять объективный выбор как технологии лазерного вмешательства, так и оптимальных энергетических параметров лазерного излучения.
2. Адекватный выбор технологий и параметров субпороговых лазерных вмешательств обеспечивает максимально щадящее селективное воздействие на структуры глазного дна, что особенно важно при лечении заболеваний макулярной области.



#### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту**

1. Впервые экспериментально-морфологически и гистохимически показано повреждающее действие различных видов субпороговых лазерных вмешательств на структуры хориоретинального комплекса.
2. Доказана возможность восстановления поврежденных структур и внутриклеточного метаболизма в тканях хориоретинального комплекса в результате внутриклеточной и тканевой регенерации.
3. Установлена корреляционная зависимость динамики морфологических и гистохимических изменений в структурах хориоретинального комплекса при исследуемых видах субпороговых лазерных вмешательств.

#### **Апробация работы**

Материалы диссертации были доложены на научно-практической конференции «Лазеры в офтальмологии: вчера, сегодня, завтра» (Москва, 2009), 8 научно-практической конференции «Современные технологии лечения витреоретинальной патологии - 2010» (Москва, 2010), 9 съезде офтальмологов России (Москва, 2010). Результаты работы доложены на заседании проблемной комиссии НИИ глазных болезней РАМН 11.07.2011.

#### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 10 работ, из них 3 - в изданиях, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией.

#### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 128 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 57 рисунками и 8 таблицами. Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, главы собственных исследований, включающей 6 разделов, заключения, выводов. Список литературы включает 227 источников, в том числе 64 отечественных и 163 зарубежных.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

В основу работы положены результаты экспериментальных исследований, проведенных на 64 глазах 32 кроликов породы шиншилла-серый. В эксперименте использовали лазерную офтальмологическую установку «Simphony» 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 0.810 мкм в непрерывном, микроимпульсном режимах и режиме транспупиллярной термотерапии. В зависимости от используемого вида субпороговой технологии лазерного воздействия животные были разделены на 4 группы по 8 кроликов (16 глаз в каждой). Левые глаза всех подопытных животных служили контролем. Животных выводили из эксперимента через 1, 8 и 30 суток. Энуклеированные глаза фиксировали в 2,5% охлажденном растворе глутаральдегида. Вырезали участки стенки глазного яблока, подвергшиеся субпороговому лазерному облучению (ограниченные видимыми коагулятами), обезвоживали в спиртах и заключали в смесь эпоксидных смол эпон-аралдит. Полутонкие срезы, окрашенные полихромным красителем, исследовали и фотографировали на «Фотомикроскопе III». Ультратонкие срезы контрастировали по Рейнольдсу и исследовали на трансмиссионном микроскопе EM-10C (Opton, Германия). Для гистохимического исследования готовили парафиновые срезы с последующим светогистохимическим исследованием по методу Косса и морфометрическим анализом при помощи компьютерной телефотометрической программы "Видеотест". Обработка полученных количественных данных проводилась с помощью компьютерных статистических программ. Достоверным считали отличие при  $p < 0,05$ .

### Результаты исследований

*В 1-й группе* субпороговое воздействие проводили непрерывным излучением диодного лазера на длине волны 0.81 мкм (Мирзабекова К.А. 2004). Через 1 сутки после лазерного воздействия обращали на себя

---

внимание отек и неравномерная толщина РПЭ, истончение и фрагментация наружных сегментов ФР, частичный некробиоз в НЯС, межклеточный отек во внутреннем ядерном слое (ВЯС). Через 8 суток отмечали уменьшение отека в слое РПЭ и восстановление его целостности, начало регенерации наружных сегментов ФР, гипертрофия и прорастание в НЯС отростков Мюллеровских клеток. Через 30 суток происходила практически полная регенерация наружных члеников ФР, РПЭ имел однородную пигментацию. В НЯС сохранялись бесклеточные участки, частично замещенные гипертрофированными отростками Мюллеровских клеток. Отечность внутренних слоев была значительно меньше. Мембрана Бруха (МБр) на всех сроках была истончена, но сохраняла свою целостность.

Во 2-й группе проводили субпороговую микроимпульсную лазеркоагуляцию (СМИЛК) излучением диодного лазера на длине волны 0.81 мкм. Через 1 сутки после воздействия отмечали прерывистость и мелкую вакуолизацию в слое РПЭ, гомогенизацию наружных сегментов ФР, незначительный межклеточный отек в НЯС. Через 8 суток происходила неполная регенерация РПЭ и неравномерное восстановление наружных сегментов ФР. К концу 30-х суток отмечалось уже полное восстановление целостности РПЭ, слой ФР приобретал свое нормальное строение и плотно прилегал к РПЭ. В НЯС все еще сохранялись локальные зоны незначительного межклеточного отека. Внутренние слои и МБр сохраняли свою послойную структуру во все сроки наблюдения.

В 3-й группе проводили субпороговое воздействие с использованием непрерывного излучения на длине волны 0.532 мкм (Akduman L. с соавт. 1999, Павлова Е.С. 2004). Через 1 сутки после лазерного воздействия изменения в ХРК выражались в виде гидропической дегенерации клеток РПЭ, фрагментации ФР, скоплением жидкости в субретинальном пространстве, утрате ядер НЯС и выраженного межволоконного отека в слое нервных волокон. К концу 8-х суток были уже отмечены признаки восстановления целостности РПЭ, регенерация внутренних сегментов, в НЯС

сохранялся значительный межклеточный отек. Через 30 суток происходило полное восстановление целостности РПЭ и слоя ФР. В НЯС сохранялись малоклеточные зоны, хотя в целом НЯС приобретал обычную структуру. Внутренние слои также становились неотличимыми от соседних неизменных участков. МБр во всем периоде наблюдения сохраняла свою целостность, хотя и была истончена.

В 4-й группе использовали режим ТТТ непрерывным лазерным излучением на длине волны 0.81 мкм. Через 1 сутки после лазерного воздействия на гистологических препаратах можно было увидеть перинуклеарный отек и неравномерную пигментацию клеток РПЭ, наружные сегменты ФР были фрагментированы и частично фагоцитированы, в НЯС встречались расширенные межклеточные пространства. В слое нервных волокон отмечался межволоконный отек, в то же время слои биполярных и ганглиозных клеток были без изменений. К концу 8-х суток РПЭ приобретал обычные размеры, однако сохранялась диссоциация гранул в апикальных отделах клеток. ФР восстанавливали свою структуру, в НЯС еще сохранялся незначительный отек. В слое нервных волокон можно было отметить значительное снижение межволоконного отека. Через 30 суток в РПЭ еще сохранялась неравномерная пигментация, слой ФР был несколько увеличен по толщине, что являлось признаком регенерации. НЯС и слой нервных волокон имели обычное строение. МБр на всех сроках сохраняла свою целостность, однако в ранние периоды отмечалось ее истончение.

При сравнительном анализе морфологических изменений в исследуемых группах через 1 сутки было выявлено, что во всех исследуемых группах основные изменения происходили на уровне РПЭ и прилежащего слоя ФР. В 1-й и 3-й группах эти изменения были наиболее выражены и заключались в отеке и вакуольной дегенерации клеток РПЭ, фрагментации и отеке наружных сегментов ФР, разрежении НЯС за счет локального некролиза ядер ФР и межклеточного отека. Во ВЯС и слое нервных волокон также отмечался межклеточный и межволоконный отек. Во 2-й и 4-й группах

выявлялись прерывистость РПЭ с мелкими вакуолями в базальном отделе и перинуклеарный отек клеток РПЭ с неравномерной пигментацией соответственно. Наружные сегменты ФР были лишь частично фрагментированы. В НЯС отмечалось расширение межклеточных пространств за счет незначительного межклеточного отека. Внутренние слои сетчатки практически не претерпевали каких-либо изменений. МБр была неравномерно истончена, но сохраняла свою целостность во всех группах исследования. Проницаемость ХК была нарушена, в сосудах среднего калибра (ССК) отмечался стаз крови различной степени выраженности во всех группах воздействия. Однако в 1-й, 3-й и 4-й группах исследования эти изменения были более выражены, чем во 2-й. Через 8 суток во всех исследуемых группах отмечались признаки неполного восстановления РПЭ на фоне неоднородной пигментации слоя клеток РПЭ. Уменьшалась отечность слоя ФР и выявлялась неравномерная регенерация наружных сегментов ФР различной степени выраженности. В 1-й и 3-й группе в НЯС определялось уменьшение разреженности клеток вследствие уменьшения межклеточного отека и гипертрофии Мюллеровских клеток. Внутренние слои сетчатки также были значительно менее отечны, чем в острый период, и содержали проминирующие отростки Мюллеровских клеток. Во 2-й и 4-й группах НЯС имел практически нормальный вид, хотя отдельные картины межклеточного отека все же сохранялись. Внутренние слои имели неизменную послойную структуру, несмотря на локальную и незначительную отечность клеток. МБр сохраняла свою целостность. Во всех группах исследования проходимость ХК и ССК была нарушена за счет спазма сосудистой стенки и отека эндотелиальных клеток, однако во 2-й группе ХК и ССК уже были частично проходимы. Сравнительный анализ морфологических изменений в исследуемых группах через 30 суток выявил, что во всех группах исследования происходило полное восстановление РПЭ и его пигментации, однако местами отмечалась локальная неравномерность распределения пигмента в слое РПЭ. Слой ФР приобретал свое нормальное

значение, хотя в *1-й, 3-й и 4-й группах* исследования отмечалось увеличение толщины слоя ФР, что могло свидетельствовать о незавершенной дифференцировке наружных сегментов ФР. НЯС восстанавливал свою обычную структуру во всех группах исследования. В *1-й и 3-й группах* сохранялись малоклеточные зоны в НЯС, что свидетельствовало о частичной утрате 1-х нейронов, которые замещались гипертрофированными Мюллеровскими клетками. ВЯС приближался к своему нормальному строению, хотя в *1-й и 4-й группах* отмечалась его умеренная отечность. МБр прослеживалась на всем протяжении во всех группах, но в *1-й и 3-й группах* оставалась истонченной. Восстановление проходимости ХК и ССК происходило во всех исследуемых группах, однако в *4-й группе* диаметр ХК и ССК оставался меньше исходного. Таким образом, при воздействии непрерывным лазерным излучением на длине волны 0,81 мкм и 0,532 мкм происходит частичная утрата 1-х нейронов с последующим замещением бесклеточных зон Мюллеровскими клетками.

16 образцов хориоретинальной ткани (64 препарата) подвергли гистохимическому исследованию по методу Косса для выявления фосфата кальция в гистологических препаратах путем их импрегнации раствором нитрата серебра. При статистическом анализе результаты считали достоверными при  $p < 0,05$ . Для сравнительного анализа гистохимического исследования ХРК после воздействия в различных режимах субпорогового лазерного излучения на длинах волн 0,81 мкм и 0,532 мкм была определена статистическая совокупность, единицей наблюдения которой являлись гранулы фосфата кальция, определяемые в сенсорной сетчатке. Наиболее значимыми морфометрическими параметрами были площадь и оптическая плотность включений. Исходя из этого, были выбраны следующие учетные признаки: площадь и оптическая плотность гранул фосфата кальция, которые определялись в контрольной группе и в 4-х группах после воздействия на сетчатку лазерным излучением через 1, 8 и 30 суток. За норму были приняты

данные площади и оптической плотности депозитов фосфатов кальция, локализованных в сенсорной сетчатке в контрольной группе (Табл. 1).

Показатели	Гранула фосфата кальция (в сенсорной сетчатке)
Средняя площадь	1,31±0,11
Средняя оптическая плотность	0,09±0,002

Таблица 1.

Показатели средней площади ( $\text{мкм}^2$ ) и средней оптической плотности гранул фосфата кальция (усл.ед.) в контрольной группе

В результате статистического анализа полученных данных были выявлены изменения показателей площади и оптической плотности микроконгломератов кальция в сенсорной сетчатке в зависимости от времени наблюдения в каждой экспериментальной группе (Табл. 2 - 3, рис. 1 - 2). Также проводили определение достоверности различий уровня анализируемых показателей как от нормы во всех экспериментальных группах, так и в динамике по времени наблюдения.

Временной период	Группы воздействия			
	1-я группа	2-я группа	3-я группа	4-я группа
1-е сутки	4,04±0,05	3,83±0,1	4,33±0,04	4,51±0,08
8-е сутки	21,80±8,31	6,83±2,09	29,89±13,44	10,53±2,38
30-е утки	6,88±2,01	4,78±0,86	8,08±1,91	6,06±0,20

Таблица 2.

Площадь гранул фосфата кальция в сенсорной сетчатке в динамике наблюдения в зависимости от вида воздействия ( $\text{мкм}^2$ ) ( $M \pm m, p < 0.05$ )

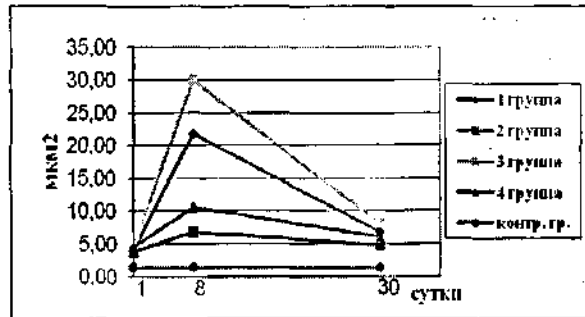


Рис. 1. Сравнительная динамика изменения площади гранул фосфата кальция в сенсорной сетчатке (мкм<sup>2</sup>)

Временной период	Группы воздействия			
	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа
1-е сутки	0,12±0,00	0,11±0,00	0,12±0,00	0,12±0,00
8-е сутки	0,22±0,003	0,21±0,00	0,22±0,002	0,22±0,003
30-е сутки	0,21±0,00	0,19±0,003	0,23±0,00	0,20±0,00

Таблица 3.

Оптическая плотность гранул фосфата кальция в сенсорной сетчатке в динамике наблюдения в зависимости от вида воздействия (усл. ед.) ( $M \pm m$ ,  $p < 0.05$ )

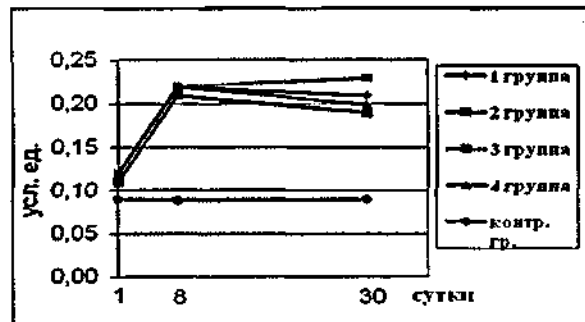


Рис. 2. Сравнительная динамика изменения оптической плотности гранул фосфата кальция в сенсорной сетчатке (усл. ед.)



Субпороговое лазерное воздействие на сенсорную сетчатку в 1-й группе по сравнению с показателями в контрольной группе вызвало изменения, как площади, так и оптической плотности включений во все периоды наблюдения. При этом происходило достоверное увеличение площади включений через 1-е и 8-е сутки с последующим ее уменьшением через 30 суток (4,04 мкм<sup>2</sup> - 21,80 мкм<sup>2</sup> - 6,88 мкм<sup>2</sup> по сравнению с нормой 1,31 мкм<sup>2</sup> при  $p < 0.05$ ), что свидетельствовало о частичной обратимости метаболических нарушений в клетках сенсорной сетчатки к этому сроку. Значения оптической плотности гранул фосфата кальция имели сходную динамику (0.12 усл.ед. - 0.22 усл.ед. - 0.21 усл. ед. при норме 0,09 усл.ед.,  $p < 0.05$ ).

Показатели площади и оптической плотности депозитов фосфата кальция сетчатки во 2-й группе также имели достоверные различия по сравнению с нормой ( $p < 0.05$ ) во все периоды наблюдения. Однако, в динамике уровней этих показателей в процессе эксперимента было выявлено, что площадь включений изменялась незначительно (3,83 мкм<sup>2</sup> - 6,83 мкм<sup>2</sup> - 4,78 мкм<sup>2</sup> при норме 1,31 мкм<sup>2</sup>,  $p > 0.05$ ), в то время как оптическая плотность достоверно нарастала к концу 8-х суток (0,11 усл.ед. - 0,21 усл.ед. при норме 0,09 усл. ед.,  $p > 0.05$ ) с последующим снижением через 30 суток до 0,19 усл. ед.

При анализе данных, полученных в 3-й группе, отмечалось статистически достоверное различие показателей площади и оптической плотности гранул фосфата кальция в сенсорной сетчатке по сравнению с исходными значениями в различные периоды наблюдения после воздействия ( $p < 0.05$ ). Было выявлено достоверное увеличение площади гранул через 1 и 8 суток наблюдения (соответственно с 1,31 мкм<sup>2</sup> до 4,33 мкм<sup>2</sup> и 29,89 мкм<sup>2</sup> при  $p < 0.05$ ). К концу 30-х суток площадь включений фосфата кальция уменьшилась до 8,08 мкм<sup>2</sup> ( $p < 0.05$ ). При определении оптической плотности гранул наблюдался достоверный рост этого показателя на протяжении всего периода наблюдения (с 0,09 усл. ед. в норме

---

до 0,12 усл.ед. - 0,22 усл.ед. - 0,23 усл.ед.), что вероятнее всего было связано с более глубокими метаболическими нарушениями в клетках сенсорной сетчатки.

Анализ полученных данных в 4-й группе показал статистически достоверное различие показателей площади и оптической плотности гранул фосфата кальция в сенсорной сетчатке в различные периоды наблюдения с наиболее выраженными нарушениями клеточного обмена в сенсорной сетчатке через 8 суток после лазерного воздействия ( $p < 0,05$ ). Было отмечено достоверное увеличение площади гранул к концу 8-х суток наблюдения (соответственно с 1,31 мкм<sup>2</sup> до 4,51 мкм<sup>2</sup> и 10,53 мкм<sup>2</sup> при  $p < 0,05$ ). Через 30 суток имела тенденция сокращения площади гранул до 6,06 мкм<sup>2</sup> ( $p < 0,05$ ). Аналогичную динамику наблюдали при определении оптической плотности, что также подтверждалось уровнем значимости различий показателей (0,12 усл.ед. - 0,22 усл.ед. - 0,20 усл.ед. по сравнению с нормой 0,09 усл.ед. при  $p < 0,05$ ).

В сравнительном аспекте была выявлена четкая тенденция увеличения площади гранул фосфата кальция от 1-х к концу 8-х суток и соответственно уменьшения – через 30 суток при всех видах воздействия на сенсорную сетчатку по сравнению с исходными данными. При этом была доказана достоверность различий этих показателей ( $p < 0,05$ ) в динамике наблюдения в зависимости от вида воздействия. Также проводили сравнение уровня оптической плотности гранул фосфата кальция в сенсорной сетчатке в динамике наблюдения и в зависимости от вида воздействия по сравнению с контрольной группой. Помимо этого рассчитывались критерии достоверности различий воздействия указанных методов. Сравнительные данные средней оптической плотности гранул фосфата кальция в сенсорной сетчатке свидетельствовали о значительном влиянии всех видов воздействия на этот показатель по сравнению с контрольной группой (0,09 усл.ед. при  $p < 0,05$ ). Достоверной являлась разница уровней оптической плотности гранул в течение всех периодов наблюдения (1-8-30-е сутки). В процессе

исследования была выявлена закономерность роста этого показателя при всех видах воздействия через 1 - 8 суток. Вместе с тем в 3-й группе продолжался рост оптической плотности гранул к концу 30-х суток (0,12 усл. ед. - 0,22 усл. ед. - 0,23 усл. ед.), в то время как при других методах к этому сроку наблюдалось его снижение. Вышеуказанные изменения площади и оптической плотности гранул фосфата кальция свидетельствовали о том, что к концу 30-х суток процесс метаболического и морфологического восстановления сенсорной сетчатки еще не завершился. Вместе с тем, наиболее выраженные изменения исследуемых показателей, отражающих метаболические нарушения и повреждение клеток сенсорной сетчатки, отмечали в 1-й и 3-й группах. Во 2-й и 4-й группах изменения этих показателей в сенсорной сетчатке были менее значительны, поэтому степень дезорганизации клеточного обмена в сенсорной сетчатке была значительно меньше, что, с нашей точки зрения, закономерно, поскольку на морфологическом уровне в этих группах субпороговое лазерное воздействие вызывало значительно меньшие повреждения структур ХРК.

#### **ВЫВОДЫ**

1. Впервые на материале 64 глаз (32 кроликов породы шиншилла) с помощью светооптического, электронно-микроскопического и гистохимического методов проведено комплексное исследование влияния различных технологий субпорогового лазерного воздействия на структуры хориоретинального комплекса в остром, подостром и отдаленном периодах.
2. Воздействие непрерывным лазерным излучением на длине волны 0,81 мкм в субпороговом режиме через 1 сутки приводит к умеренному отеку во всех структурах хориоретинального комплекса, фрагментации и частичному некробиозу в наружном ядерном и фоторецепторном слоях. Через 8 суток отмечены признаки восстановления и заместительной гипертрофии клеток ретинального пигментного эпителия, уменьшения отека во всех слоях с

---

последующей незавершенной регенерацией наружных сегментов фоторецепторов к концу 30-х суток.

3. В результате воздействия лазерным излучением на длине волны 0,81 мкм в субпороговом микроимпульсном режиме через 1 сутки обнаружены минимальные нарушения в ретинальном пигментном эпителии в виде его прерывистой пигментации, незначительного межклеточного отека наружного ядерного слоя. Через 8 суток отмечено неравномерное восстановление пигментации ретинального пигментного эпителия, наружных сегментов фоторецепторов. К концу 30 суток состояние структур хориоретинального комплекса было приближено к исходному.

4. Воздействие непрерывным лазерным излучением на длине волны 0,81 мкм в режиме транспульсарной терапии через 1 сутки вызывает возникновение отечных явлений в ядрах клеток ретинального пигментного эпителия и в межклеточных пространствах в наружном ядерном слое, фрагментацию наружных сегментов фоторецепторов. Через 8 суток происходит резорбция отека клеток ретинального пигментного эпителия и регенерация фоторецепторов с дальнейшим восстановлением нормальной архитектоники наружного ядерного слоя и неполной регенерацией наружных сегментов фоторецепторов к концу 30 суток.

5. После воздействия непрерывного лазерного излучения на длине волны 0,532 мкм в субпороговом режиме через 1 сутки морфологические изменения отмечены во всех слоях хориоретинального комплекса, наиболее выраженные на уровне ретинального пигментного эпителия в виде гидропической дегенерации клеток, затрагивая при этом фоторецепторный и наружный ядерный слой. Через 8 суток выявлены признаки восстановления клеточной структуры ретинального пигментного эпителия, частичной резорбции отека в фоторецепторном и наружном ядерном слоях. К концу 30 суток не происходит полного восстановления структур хориоретинального комплекса, главным образом из-за незавершенной дифференцировки

наружных сегментов фоторецепторов и локальной гипоцеллюлярности в наружном ядерном слое.

6. Непрерывное лазерное излучение на длинах волн 0,81 мкм и 0,532 мкм в субпороговых режимах вызывает изменения в тканях хориоретинального комплекса с вовлечением всех слоев сетчатой оболочки. В то время как при воздействии лазерным излучением на длине волны 0,81 мкм в микроимпульсном режиме и в режиме транспупиллярной терапии основные изменения происходят только в наружных слоях сетчатки без выраженных изменений внутренних слоев.

7. Электронно-микроскопическое исследование позволило расширить представления о степени и уровне изменений в хориоретинальном комплексе после воздействия субпороговым лазерным излучением, особенностью которого следует считать ультраструктурные повреждения клеточных мембран и органелл, в основном митохондрий, внутренних сегментов фоторецепторов и РПЭ, повреждение которых ведет к нарушению клеточного метаболизма.

8. Воздействие лазерным излучением на длинах волн 0,81 мкм и 0,532 мкм в субпороговых режимах через 1 сутки во всех случаях приводит к дисбалансу ионов  $Ca^{2+}$ , вызывающее статистически значимое ( $p < 0.05$ ) нарушение клеточного метаболизма, нарастающего к концу 8 суток; через 30 суток в клетках сенсорной сетчатки отмечены частично обратимые метаболические нарушения различной интенсивности. Наиболее выраженные изменения клеточного метаболизма выявлены при воздействии непрерывным лазерным излучением на длинах волн 0,81 мкм и 0,532 мкм в субпороговых режимах.

9. Ультраструктурные повреждения органелл клеток хориоретинального комплекса являются большей частью обратимыми, индуцирующие в свою очередь процессы внутриклеточной регенерации, обеспечивая адекватное функционирование жизнеспособных клеток и образуемых ими тканей, что и

---

и лежит в основе терапевтического действия субпороговых лазерных технологий.

10. Субпороговые лазерные вмешательства в микроимпульсном режиме и в режиме транспупиллярной терапии наиболее избирательны и прецизионны по сравнению с другими видами субпороговых лазерных технологий, что имеет принципиально важное значение при использовании этих технологий в лечении заболеваний макулярной области.

#### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Патоморфологические проявления взаимодействия субпорогового лазерного излучения с тканями хориоретинального комплекса // Семинар «Макула – 2008»: Сб. тезисов – Ростов на Дону, 2008. – С. 433-435. (соавт. Федоров А.А., Большунов А.В.).
2. Патоморфологические и гистохимические проявления взаимодействия лазерного излучения с тканями хориоретинального комплекса (обзор литературы) // Вестник офтальмологии. – 2009. - №3. – С. 61-64. (соавт. Федоров А.А., Большунов А.В.).
3. Морфологические изменения сетчатой оболочки при так называемых субпороговых лазерных вмешательствах. Экспериментальное исследование // Научно-практическая конференция «Лазеры в офтальмологии: вчера, сегодня, завтра»: Сб. научн. статей – М., 2009. – С. 533-536. (соавт. Федоров А.А., Большунов А.В.).
4. Гистохимические изменения сетчатой оболочки при субпороговых лазерных вмешательствах. Экспериментальное исследование // Международная конференция «Восток – Запад»: Сб. тезисов – Уфа, 2010. – С. 62. (соавт. Сухоруков В.С., Большунов А.В.).
5. Гистохимические изменения сетчатой оболочки при субпороговых лазерных вмешательствах. Экспериментальное исследование // 8 Научно-практическая конференция «Современные технологии лечения

витреоретинальной патологии – 2010»: Сб. научн. статей – М., 2010. – С.173-175. (соавт. Сухоруков В.С.).

6. Морфологические особенности взаимодействия лазерного излучения с тканями хориоретинального комплекса при «субпороговых» лазерных вмешательствах // 9 Съезд офтальмологов России: Сб. тезисов – М., 2010. – С. 512. (Стендовый доклад) (соавт. Федоров А.А., Большунов А.В.).

7. Сравнительное экспериментальное изучение морфологических и гистохимических изменений тканей хориоретинального комплекса при субпороговых лазерных вмешательствах // Вестник офтальмологии. – 2011. - №5. – С. 10-14. (соавт. Федоров А.А., Большунов А.В.).

8. Экспериментальное изучение морфологических и гистохимических изменений в тканях хориоретинального комплекса при субпороговых лазерных технологиях // Офтальмология в Белоруссии. – 2011. - №2. – С. 38-47. (соавт. Федоров А.А., Большунов А.В.).

9. Морфологические и гистохимические изменения тканей хориоретинального комплекса при субпороговых лазерных вмешательствах // 9 Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Федоровские чтения – 2011»: Сб. тезисов – М., 2011. – С. 274. (соавт. Федоров А.А., Большунов А.В.).

10. Гистохимические изменения в сенсорной сетчатке при субпороговых лазерных вмешательствах // Катарактальная и рефракционная хирургия (Рефракционная хирургия и офтальмология). – 2011, - т.11, - № 3, – С.44-47.

---





---

Подписано в печать: 20.09.11  
Объем: 1,5 усл.п.л.  
Тираж: 100 экз. Заказ № 502  
Отпечатано в типографии «Реглет»  
119526, г. Москва, ул.Рождественка, 5/7,стр.1  
(495) 978-43-34; [www.reglet.ru](http://www.reglet.ru)

---

LONA  
18221

11-18221