

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЛАЗЕР- И ФОТОИНДУЦИРОВАННОЙ МОДЕЛИ ТРОМБОЗА ВЕТВИ ВЕНЫ СЕТЧАТКИ

Посредством офтальмоскопии, оптической когерентной томографии, флуоресцентной ангиографии и гистологических исследований доказано, что фотоиндуцированная модель является более адекватной и патогенетически направленной за счет наличия тромба, формирование и строение которого соответствует патогенезу образования тромба в естественных условиях, и сохранения сосудистой стенки, в отличие от существующих моделей, получаемых при помощи лазеркоагуляции.

Ключевые слова: модель тромбоза ветви центральной вены сетчатки, фотодинамическое воздействие, лазеркоагуляция.

Актуальность

Изучение вопросов патогенеза и лечения тромбоза ветви центральной вены сетчатки (ЦВС) [3-5] возможно только в условиях эксперимента, поэтому актуальным является создание его адекватных моделей.

Существующие на сегодняшний день экспериментальные модели, получаемые лазерными и хирургическими способами, травматичны, отличаются высоким риском осложнений, низкой воспроизводимостью и преходящим характером тромбоза [8,10,12-15, 17].

На наш взгляд, наиболее патогенетически обоснованным для создания модели тромбоза ветви ЦВС является использование фотодинамического эффекта, основой которого выступает фототоксическое повреждение эндотелия сосудов, приводящее к стазу и агрегации клеток с последующей окклюзией [2,6,7,9,11,16].

Цель

Провести сравнительный анализ фотоиндуцированной модели тромбоза ветви ЦВС с моделью, полученной посредством лазеркоагуляции.

Материалы и методы

Экспериментальное моделирование тромбоза ветви ЦВС выполнено на 20 кроликах (20 глаз) породы Шиншилла весом 1,5-2 кг. Животные были разделены на две группы: у 10 кроликов (10 глаз) моделирование тромбоза осуществляли посредством фотодинамического воздействия, у оставшихся 10 кроликов (10 глаз) – посредством лазерного воздействия.

Для фотодинамического воздействия использовали фотосенсибилизатор (ФС) хлоринового ряда – бис-N-метилглюкаминую соль хлорина е6. ФС вводили внутривенно в дозе 2,4 мг/кг веса животного. Через 10 минут (время, достаточное для максимального накопления ФС в сосудах сетчатки по данным флуоресцентной диагностики [1]) транспупиллярно проводили лазерное облучение ретинальных сосудов на выходе из диска зрительного нерва с плотностью энергии 80 Дж/см² при помощи лазерного офтальмо-микрохирургического комплекса «АЛОД-01» («Алком-Медика», Санкт-Петербург) с длиной волны 662 нм. Диаметр пятна лазерного излучения составлял 3,0 мм.

Высокоинтенсивную лазеркоагуляцию проводили на лазерном аппарате «Ultima» с длиной волны 532 нм. Лазеркоагуляты наносились с перекрытием соседних, на вену в месте выхода из ДЗН, в количестве 30-40, пятном 200 мкм, с экспозицией 0,15 нс, мощностью 200-240 мВт, до получения устойчивого спазма сосуда.

Методы обследования включали офтальмоскопию с фоторегистрацией, флуоресцентную ангиографию (ФАГ), оптическую когерентную томографию (ОКТ) («Stratus OCT-3000», «Carl Zeiss», Германия). Срок наблюдения с последующим выведением из эксперимента – через 30 минут, 1, 3, 7 и 14 суток.

Для проведения морфологических исследований энуклеированные глазные яблоки фиксировали в растворе нейтрального формалина, подвергали макромикроскопическому препарированию, затем промывали проточной водой, обезживали в спиртах восходящей кон-

центрации и заливали в парафин, выполняли серии меридиональных гистологических срезов с применением окраски гематоксилин-эозином. Препараты изучали под микроскопом «Leica DM LB2» при 50-, 200-, 400-кратном увеличении с последующим фотографированием.

Результаты

Офтальмоскопически на фотоиндуцированных моделях через 30 минут после фотодинамического воздействия отмечали сужение артерии, расширение, извитость и напряжение пораженной вены; вдоль сосудистой аркады – множественные интратетинальные штрихообразные кровоизлияния; отек перипапиллярно по ходу сосудистой аркады и в центральной зоне сетчатки; границы диска зрительного нерва слегка смазаны. К первым суткам количество геморрагий увеличилось, отмечалось большое число экстравазатов вокруг пораженного сосуда, отек тканей усиливался. На 3-и сутки число геморрагий и экстравазатов уменьшалось, отек тканей нарастал и достигал пика. Тромбированная ветвь была полнокровной, имела патологическую извитость, четкообразность, темную окраску, отмечалось появление микроаневризмов, расширение капиллярной сети. К 7-м суткам наблюдали дальнейшее уменьшение геморрагий и экстравазатов, вена сохраняла патологическую извитость, неравномерный калибр и темную окраску, соответствующая артерия имела прямолинейный ход, была сужена, отмечался симптом «серебряной проволоки», отек тканей уменьшился. К 14-му дню кровоизлияния частично рассасывались, однако отек сетчатки над пораженной аркадой и центральной зоной сохранялся, что подтверждалось данными ОКТ.

На глазах, подвергнутых лазеркоагуляции, в первые сутки фиксировались единичные кровоизлияния в области пораженного сосуда, которые усиливались к третьему дню наблюдения. Только к 7-м суткам отмечалась картина тромбоза с расширением, извитостью, нарушением кровотока в пораженном сосуде и кровоизлияниями вдоль пораженной вены, отеком сетчатки парапапиллярно, в зоне воздействия и в зоне проекции макулы. К 14-му дню кровоизлияния и отек сохранялись, формировалась атрофия зрительного нерва.

По данным флюоресцентной ангиографии на фотоиндуцированных моделях в 1-е сутки

выявлялось отсроченное заполнение контрастом окклюдированного венозного сосуда по сравнению с другими ветвями ЦВС, кровоток в поврежденном сосуде был резко затруднен, в области формирования тромба сосудистая стенка прокрашивалась контрастным веществом, отмечалось удлинение венозной перфузии, неравномерное контрастирование вен. К 3-м суткам окклюдированный сосуд не заполнялся контрастом и выглядел темным, тогда как остальные ветви ЦВС были заполнены флюоресцеином, отмечалось сужение артерий, отсутствие нормального ветвления. В бассейне пораженного сосуда отмечалось отсутствие перфузии в капиллярах сетчатки, на границах зон ишемии капилляры были резко расширены и имели вид «обрубков», что особенно хорошо проявлялось на 7-е сутки наблюдения. В этих же зонах выявлялись капиллярные аневризмы, отмечался выход флюоресцина за пределы сосуда. В поздних фазах наблюдался гиперфлюоресценция ДЗН и в зонах отека сетчатки, перфузия в перифовеолярных капиллярах была нарушена.

На моделях, полученных путем лазеркоагуляции, наблюдалось замедление контрастирования пораженного сосуда в 1-е сутки, прокрашивание окружающих тканей флюоресцеином. В первые три дня отмечалось нарушение целостности сосудистой стенки, гиперфлюоресценция в зонах отека сетчатки. К 7-м суткам контрастирование сосуда отсутствовало.

По данным ОКТ на фотоиндуцированных моделях в 1-е сутки толщина сетчатки увеличилась на 60-70 мкм – в среднем до 199 мкм (толщина интактной сетчатки – до 132 мкм), определялись участки серозной отслойки нейроэпителия парапапиллярно (высотой до 357 мкм), а также множественные прететинальные и интратетинальные кровоизлияния. При исследовании на 3-и сутки зон экссудативной отслойки нейроэпителия выявлено не было, однако сохранялся диффузный отек сетчатки, достигавший своего пика (высотой до 210 мкм). На 7-е сутки после эксперимента происходила частичная резорбция отека (высотой до 170 мкм). Через 2 недели начинал формироваться неравномерно пигментированный хориоретинальный атрофический очаг, местами сохранялись участки отека сетчатки (высотой до 145 мкм).

После лазеркоагуляции в 1-е сутки отека сетчатки не наблюдалось, отмечались единич-

ные интравитреальные кровоизлияния. К третьим суткам толщина сетчатки увеличилась до 170 мкм, количество геморрагий существенно возросло. На 7-е сутки отек достигал своего пика (до 200 мкм), а к 14-суткам происходила частичная его резорбция (до 150 мкм).

По данным морфологических исследований на фотоиндуцированных моделях на 1-е сутки отмечали выраженный отек ДЗН и перипапиллярных участков сетчатки, полнокровие всех сосудов этой зоны, способствующее агрегации форменных элементов крови с явлениями сладж-синдрома (рис. 1, цветная вкладка). В поверхностных венулах наблюдали значительное повышение проницаемости сосудистой стенки, что привело к диапедезным кровоизлияниям без нарушения целостности сосудов. Свободные эритроциты оседали с формированием мелких кровоизлияний в кортикальных слоях стекловидного тела глаза, но основная масса их пропитывала сетчатку, усугубляя ее структурные нарушения. К 3 суткам явления отека нарастали, особенно он был выражен в начальном отрезке зрительного нерва, но кровоизлияния носили очаговый поверхностный характер, в основном в слое нервных волокон перипапиллярной сетчатки. Сладж-синдром перешел в тромбоз крупных сосудов, в ЦВС на месте разрушенного эндотелия отмечали отложение фибрина, скопление лейкоцитов с формированием пристеночного «красного» тромба из-за обильного пропитывания эритроцитами. В венулах тромбирование было неравномерным, выявлено чередование с сохранением просвета сосуда и появлением в стенках «сосудистых почек» – развитие неоваскуляризации (рис. 2 а, б, цветная вкладка). К 7 суткам количество новообразованных сосудов увеличивалось. На фоне неравномерного тромбирования и частичной облитерации мелких сосудов на внутренней поверхности сетчатки они сохранялись в ее толще, особенно в отечной части слоя нервных волокон оптикоганглионаров «зрительной лучистости» вблизи ДЗН. Недосформированность стенки новообразованных сосудов приводила к появлению мелких диапедезных экстравазатов. По истечении двух недель пролиферативные процессы сменялись инволютивными. Отмечено сохранение неравномерной отечности, очаговый глиоз сетчатки, замещение фиброзной тканью участков деструкции оболочки и зрительного нерва с тенденцией к формированию хориоретинального рубца.

На моделях, полученных посредством лазеркоагуляции, в 1-е сутки преобладали альтерационные явления, обусловленные повреждающим действием лазера. Стенки мелких сосудов были разрушены, вследствие нарушения целостности сосудистой стенки – появление геморрагий. Механизмы тромбирования направлены на закрытие дефектов сосудов, поэтому за счет участия многофакторной внутренней системы гемостаза отмечали, в отличие от фотоиндуцированной модели, не дилатацию, а спазм венул, в формировании тромба принимали участие в равной степени как внутрисосудистые, так и тканевые компоненты (рис. 3, цветная вкладка). К третьим суткам расширялась зона ишемического некроза, также как и в фотоиндуцированной модели отмечали начальные элементы компенсаторной неоваскуляризации, продолжали появляться новые очаги кровоизлияний на поверхности отечных тканей зрительного нерва и сетчатки. К седьмым суткам к имеющимся явлениям присоединилась выраженная макрофагально-воспалительная периваскулярная инфильтрация как реакция на обширные очаги некротической ткани и организующихся отдельных кровоизлияний (рис. 4 а, б, цветная вкладка). Притоки ЦВС были подвержены частичной облитерации, что приводило к ее полнокровию.

Обсуждение

Впервые модель тромбоза ветви ЦВС была получена около 30 лет назад Kohner et al. [14]. Для получения моделей тромбоза ветви ЦВС исследователи обычно применяли высокоинтенсивную лазеркоагуляцию и другие более инвазивные хирургические методы [8,10,12-15,17]. В результате использования высокоинтенсивной лазеркоагуляции создавали модели тромбозов ветвей ЦВС с ретинальной и оптической неоваскуляризацией, на которых изучались многие вопросы патогенеза и ангиогенеза, а также разрабатывались некоторые методы лечения. Преимуществами этих моделей являлись простота получения и относительная неинвазивность методики. Однако их создание сопровождалось высоким риском интравитреальных кровоизлияний, а положительные результаты получали лишь в 50% случаев, и они носили преходящий характер [8,10,12-14].

В последние годы появились единичные публикации, описывающие фотоиндуцирован-

ную модель тромбозов ветвей вен сетчатки у экспериментальных животных, преимуществами которой является селективность, направленность воздействия, меньшая травматичность. Такие достоинства метода связаны с избирательным поражением клеток эндотелия сосудов и минимальным воздействием на окружающие ткани [2,6,7,9,11,16]. Исходя из этого, получение тромбоза с использованием фотодинамического воздействия является патогенетически более обоснованным в сравнении с ранее существующими методиками, так как механизм формирования тромба в естественных условиях связан именно с повреждением эндотелиальных клеток без нарушения целостности сосудистой стенки.

В наших исследованиях мы получили фотоиндуцированную модель, что офтальмоскопически проявлялось картиной тромбоза ветви ЦВС уже в 1-е сутки после воздействия. В течение следующих дней картина нарастала и достигала пика к третьему дню. Затем наблюдалось частичное рассасывание кровоизлияний с формированием микроаневризм. На всех сроках наблюдения отмечался отек сетчатки различной степени выраженности, что подтверждалось данными ОКТ.

Модели, получаемые с помощью лазеркоагуляции, в первые сутки после воздействия отличались скудностью офтальмоскопической картины: небольшое расширение и извитость поврежденного сосуда и единичные геморрагии, обусловленные разрушением мелких сосудов. Усиление кровоизлияний, отек сетчатки, запускания пораженного сосуда выше места окклюзии начинали проявляться лишь с третьего дня и достигали пика только к 7-м суткам.

Следовательно, клиническая картина новой модели, а также острый характер ее возникновения, в отличие от ранее предложенных, полностью соответствует клиническим проявлениям тромбоза ветви ЦВС, что указывает на ее адекватность и легковоспроизводимость.

Ангиографически на фотоиндуцированных моделях показано нарушение кровотока в поврежденном сосуда, а к 3-м суткам полное отсутствие контрастирования сосуда. Отмечается прокрашивание окружающих тканей, что указывает на отек сетчатки, а в последующем — наличие темных зон ишемии сетчатки и формирование микроаневризм. Это подтверждает

формирование тромба в зоне фотодинамического воздействия.

На моделях, полученных при помощи лазеркоагуляции, отмечалось пропитывание окружающих тканей флюоресцином, нарушение целостности сосудистой стенки, к третьему дню формировались контуры сосуда, его контрастирование отсутствовало. Этот факт не соответствует механизму тромбообразования, так как первичным является формирование тромба, а кровоизлияние и нарушение целостности стенки сосуда вторично.

Гистологически уже на первые сутки были отмечены предрасполагающие факторы тромбообразования в ЦВС (повреждение эндотелия, слайд-синдром, повышенная проницаемость сосудистой стенки, отек), способствующие агрегации тромбоцитов и коагуляции фибриногена. Далее усиливалось пристеночное внутрисосудистое прикрепление тромба, появление дополнительных фиброзных структур, оседание на них форменных элементов крови, все больше перекрывающих просвет сосуда. Эти процессы сопровождались отеком и ишемическими изменениями в близлежащих оболочках с компенсаторным развитием неоваскуляризации. Данная морфологическая картина полностью подтверждала наличие тромба, формирование и строение которого соответствует патогенезу образования тромба в естественных условиях.

На моделях, полученных методом лазеркоагуляции, отмечалось нарушение целостности сосудистой стенки, в месте поражения возникало компенсаторное тромбирование (приток тромбоцитов и лимфоцитов), спазм сосудов, гемофтальм из разрушенных сосудов, то есть отмечался застой клеток крови, а не первичное формирование полноценного тромба в просвете сосуда.

Заключение

Офтальмоскопическая, ангиографическая и морфологическая картина фотоиндуцированной модели, а также острый характер ее возникновения полностью соответствует проявлениям тромбоза ветви ЦВС, что указывает на адекватность, легковоспроизводимость и патогенетическую направленность полученной модели по сравнению с моделями, индуцированными лазеркоагуляцией.

Мы полагаем, что использование фотоиндуцированной модели является перспективным

и целесообразным при разработке новых методов лечения тромбоза ветвей ретинальных вен,

а также для изучения различных вопросов патогенеза данного заболевания.

14.10.2011

Список литературы:

1. Белый Ю.А., Терещенко А.В., Володин П.Л., Шаулов В.В. Флюоресцентная диагностика при проведении фотодинамической терапии с фотосенсибилизатором хлоринового ряда в эксперименте // Офтальмохирургия. – 2009. – №2. – С. 52-56.
2. Белый Ю.А., Терещенко А.В., Велибекова Д.С. Интраокулярная лазерная доплеровская флоуметрия хориоретинального кровотока на ишемической модели тромбоза ветви ЦВС // Восток-Запад: Сб. науч. тр. международной конф. по офтальмохирургии / Под ред. Проф. М.М. Бикбова. – Уфа, 2010. – С. 357-358.
3. Кацнельсон Л.А., Танковский В.Э., Павленко Л.В. Частота тромбозов ретинальных вен у больных с гипертонической болезнью и их прогностическое значение // 9-й съезд офтальмологов Украины: Материалы. – Одесса, 1996. – С. 376-377.
4. Кацнельсон Л.А., Форофонова Т.И., Бунин А.Я. Сосудистые заболевания глаз. – М.: Медицина, 1990. – 270 с.
5. Либман Е.С., Шахова Е.В. Состояние и динамика слепоты и инвалидности вследствие патологии органа зрения в России // Съезд офтальмологов России, 7-й: Тез. докл. Ч. 2. – М., 2000. – С. 209-214.
6. Странадко Е.Ф. Механизмы действия фотодинамической терапии // Фотодинамическая терапия: Всероссийский симпозиум, 3-й: Материалы. – М., 1999. – С.3-15.
7. Allisson B., Downie G.H., Cuenca R. et al. Photosensitizers in Clinical PDT // Photodiag. Photodyn. Therapy. – 2004. – Vol. 1. – P. 27-42.
8. Campbell F.P. Retinal vein occlusion; an experimental study // Arch. Ophthalmol. – 1961. – Vol. 65. – P. 2-10.
9. Danis R.P., Yang Y., Massicotte S.J., Boldt H. C. Preretinal and optic nerve head neovascularization induced by photodynamic venous thrombosis in domestic pigs // Arch. Ophthalmol. – 1993. – Vol. 111. – N. 4. – P. 539-543.
10. Danis R.P., Wallow H. Microvascular changes in experimental branch retinal vein occlusion // Ophthalmology. – 1987. – N. 10. – P. 1213-1221.
11. Finger V.H. Vascular effects of photodynamic therapy // J. Clin. Laser Med. Surg. – 1996. – Vol. 14. – P. 323-328.
12. Hamilton A.M., Kohner E.M., Rosen D. et al. Experimental retinal branch vein occlusion in rhesus monkeys: I. Clinical appearances // Br. J. Ophthalmol. – 1979. – Vol. 63. – P. 377-381.
13. Hamilton A.M., Kohner E.M., Rosen D. et al. Experimental retinal branch vein occlusion // Am. J. Ophthalmol. – 1979. – Vol. 63. – N. 6. – P. 377-387.
14. Kohner E.M., Dollery C.T., Shakib M. et al. Experimental retinal branch vein occlusion // Am. J. Ophthalmol. – 1970. – Vol. 69. – N. 5. – P. 778-825.
15. Pournaras C. J., M. Tsacopoulos, K. Strommer, N. Gilodi, and P. M. Leuenberger Experimental retinal branch vein occlusion in miniature pigs induces local tissue hypoxia and vasoproliferative microangiopathy // Ophthalmology 97 (10), 1321-1328 (1990).
16. Shen W., He S., Han S., Ma Z. Preretinal neovascularisation induced by photodynamic venous thrombosis in pigmented rat // Ophthalmol. – 1996. – N. 24 (2 Suppl). – P. 50-52.
17. Tolentino M.J., Miller J.W., Gragoudas E.S. et al. Intravitreal injections of vascular endothelial growth factor produce retinal ischemia and microangiopathy in an adult primate. // Ophthalmology. – 1996. – Vol. 103. – N. 11. – P. 1820-1828.

UDC 617.721.6:616-006.81.04

Belii Yu.A., Tereschenko A.V., Shatskikh A.V., Velibekova D.S., Shaulov V.V., Solovjev D.K., Erohina E.V.

COMPARATIVE ANALYSIS OF LASER- AND PHOTOINDUCED MODEL OF BRANCH RETINAL VEIN OCCLUSION

By means of ophthalmoscopy, optical coherent tomography, fluorescent angiography and histological examination it was proved that photoinduced model was more adequate and pathogenetically directed to natural pathogenesis of the branch retinal vein occlusion due to clot presence and vascular wall safety as opposed to laserinduced model.

Key words: model of branch retinal vein thrombosis, photoinduced influence, lasercoagulation.