

Влияние лазерной коагуляции сетчатки на риск возникновения хориоидальной неоваскуляризации у экспериментальных животных**С.В. Иванов¹ ✉, Ю.Ю. Хзарджан¹, А.В. Смирнов², Л.В. Науменко², А.С. Таран², А.М. Чебанько², М.А. Балалина¹, В.В. Чубарикова¹, М.А. Коротков¹, И.В. Соловьева¹**¹Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Фёдорова, Волгоградский филиал, Волгоград, Россия²Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

Аннотация. Исследования были проведены на мышах линии C57Black/C и нелинейных мышах альбиносах. Сетчатка мышей подвергалась лазерному воздействию с последующим проведением офтальмоскопии и патогистологического исследования на 14-й день эксперимента. Через 2 недели офтальмоскопически определялись коагуляты I–IV степени. Повреждение у мышей пигментного эпителия сетчатки лазерным излучением с длиной волны 532 нм и дозами от 0,05 до 0,37 Вт/см² привело к формированию патологической хориоидальной неоваскуляризации.

Ключевые слова: возрастная макулярная дегенерация, хориоидальная неоваскуляризация, лазерная коагуляция сетчатки

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

Effect of retinal laser photocoagulation on the risk of choroidal neovascularization in experimental animals**S.V. Ivanov¹ ✉, Yu.Yu. Khzardzhan¹, A.V. Smirnov², L.V. Naumenko², A.S. Taran², A.M. Chebanko², M.A. Balalina¹, V.V. Chubarikova¹, M.A. Korotkov¹, I.V. Solovyova¹**¹Eye Microsurgery named after Academician S.N. Fedorov, Volgograd, Russia²Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

Abstract. Studies were performed on 5 mice of the C57Black/C line and nonlinear albino mice. The mice retinas were exposed to laser treatment followed by ophthalmoscopy and pathohistological examination on 14 days of the experiment. After 2 weeks, grade I–IV coagulations were determined ophthalmoscopically. Damage of the retinal pigment epithelium in mice by laser irradiation with a wavelength of 532 nm and doses from 0.05 to 0.37 W/cm² did not lead to the formation of pathological choroidal neovascularization.

Keywords: age-related macular degeneration, choroidal neovascularization, laser coagulation of the retina

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) – одна из основных причин слепоты у людей старше 50 лет, характеризующаяся ростом аномальных хориоидальных сосудов в наружном слое сетчатки, вызывая появление субретинальной жидкости, кровоизлияний и фиброза, что, в конечном итоге, приводит к потере центрального зрения [1].

Возрастная макулярная дегенерация – мультифакториальное заболевание, факторами риска которой являются возраст, курение, окислительный стресс, метаболический синдром и атеросклероз, приводящие к нарушению кровотока в хориоидальных сосудах сетчатки и повышению экспрессии гена VEGF-A. Ранние стадии ВМД связывают с атрофией сосудов и ишемией сетчатки, тогда как поздние

стадии характеризуются хориоидальной неоваскуляризацией (ХНВ) сосудов сетчатки [2].

Классически выделяют две формы ВМД – атрофическая, или сухая, возникающая в 80–90 % случаев и проявляющаяся в виде апоптоза пигментного эпителия, сосудов хориоидеи и фоторецепторов, и, экссудативная, или влажная, встречающаяся в 10 % случаев, для которой характерен патологический рост аномальных хориоидальных сосудов в наружном слое сетчатки, прорастающих через мембрану Бруха и вызывающих появление субретинальной жидкости, кровоизлияний и фиброза [3].

Воспроизведение модели хориоидальной неоваскуляризации на животных позволяет проводить фундаментальные исследования с целью разработки

новых методов лечения данной патологии. По данным литературы, известен метод создания модели хориоидальной неоваскуляризации у мышей при выполнении последовательной лазерной коагуляции сетчатки [4]. Авторы продемонстрировали возможность создания модели хориоидальной неоваскуляризации с помощью лазера Iridex (США) с длиной волны 532 нм у мышей за счет последовательного повреждения пигментного эпителия сетчатки.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Анализ результатов влияния энергии лазерного воздействия на риск возникновения хориоидальной неоваскуляризации у мышей.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования были проведены на 5 пигментированных половозрелых мышах линии C57Black/C и 5 половозрелых нелинейных мышах-альбиносах весом 20–25 г (ООО «НПК БиоТех», г. Москва), прошедших 2-недельный карантин в виварии НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ.

Все манипуляции с лабораторными животными и условия их содержания сопровождались соблюдением всех требований лабораторной практики при проведении доклинических исследований в Российской Федерации (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики»). Все экспериментальные исследования проводились в соответствии со статьей 11 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» и согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ Минздрава России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики»). Процедуры с участием лабораторных животных осуществлялись с учетом этических норм обращения с животными, принятыми в Директиве Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. «О защите животных, используемых для научных целей». Экспериментальное исследование одобрено этическим комитетом (справка № 2022/043 от 02.12.2022 года).

Непосредственно перед экспериментом животные наркотизировались путем внутрибрюшинного введения хлоралгидрата в дозе 400 мг/кг. Медикаментозный мидриаз достигался инстилляцией 15 мкл мидримакса (Sentiss Pharma Pvt. Ltd.) на конъюнктиву глаза.

На фоне седации при сохранении температуры тела животного на уровне осветителя ассистентом удерживалась мышь в положении на боку. Предметное стекло с каплей карбомера помещали на роговицу правого глаза и фокусировали световой поток щелевой

лампы с лазерной апертурой на пигментный эпителий сетчатки вокруг диска зрительного нерва. Лазерные коагуляты на сетчатке формировали с помощью лазерной установки Iridex OcuLight GL (США). В отличие от человеческого глаза у глаза мыши нет четко выраженной макулы, поэтому лазерное воздействие выполнялось вокруг диска на расстоянии 1 ДД от его края, с получением микровзрыва мембраны Бруха и парагезового пузырька.

Применяли следующие параметры лазерного воздействия: мощность лазерного импульса в диапазоне от 70 до 200 мВт, экспозиция от 0,05 до 0,1 мс и диаметр пятна в диапазоне от 50 до 150 мкм, количество импульсов – от 1 до 4. Дозу лазерного излучения (А) определяли по формуле:

$$A = P \times T / C,$$

где Р – энергия излучения (Вт), Т – время экспозиции (с), С – площадь светового пятна луча лазера (см²) = $\pi D^2 / 4$.

На 14-й день эксперимента лабораторные животные подвергались эвтаназии под наркозом (400 мг/кг хлоралгидрата внутрибрюшинно), глазные яблоки были энуклеированы, для фиксации был использован свежеприготовленный модифицированный раствор Давидсона [5].

Далее материал подвергался обезвоживанию в спиртах восходящей крепости и заключался в парафиновую среду Histomix. С помощью микротомы были получены срезы толщиной 4–6 мкм, которые далее фиксировали на предметном стекле. Срезы окрашивали гематоксилином и эозин-флоксинном по стандартной методике [6]. Изучение и фотофиксация микропрепаратов производилась на микроскопе AxioScope A1, оборудованном цифровой камерой AxioCam MRc5.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При первичной офтальмоскопии до начала манипуляций диск зрительного нерва у мышей был бледно-розовым, границы четкие. Сосуды ДЗН дихотомически делились с равным калибром на 2, 4, 8 и 10 часах. Сетчатка была серовато-розового цвета без анатомических ориентиров макулы и отсутствием фовеолярного рефлекса. С помощью лазерного воздействия наносились ожоги на сетчатку по вышеописанной технологии с получением коагулята от серого до интенсивно белого цвета. Через неделю при осмотре визуализировался атрофический с пигментом очажок без офтальмоскопических признаков хориоидальной неоваскуляризации.

Через 2 недели при офтальмоскопии определялись коагуляты I–IV степени по классификации L'Esperance F. Хориоидальная неоваскуляризация (ХНВ) не выявлена ни в одном из случаев.

В табл. представлены значения лазерного воздействия при выполнении коагуляции сетчатки и обнаруженные визуальные изменения в сетчатке во время процедуры и через 2 недели после ее завершения.

По данным патоморфологического исследования сетчатки пигментированных мышей и мышей-альбиносов выявлены признаки отека в слое нервных волокон, перичеллюлярный отек в ганглионарном слое от выраженной степени до умеренно выраженной.

Доза лазерного воздействия и визуальные изменения в сетчатке у мышей во время и через 2 недели после вмешательства

Номер мыши	Параметры лазерного воздействия	Доза лазерного излучения, Вт/см ²	Изменения в сетчатке после ЛК	Степень лазерного коагулята через 2 недели
1–3	Мощность 70 мВт, экспозиция 0,05 мс, диаметр пятна 100 мкм	0,045	Белое пятно без перифокального отека	1
4	Энергия лазерного импульса 90 мВт, экспозиция 0,08 мс, диаметр пятна 100 мкм	0,092	Бело-серое пятно без перифокального отека	2
5	Мощность 100 мВт, экспозиция 0,08 мс, диаметр пятна 100 мкм	0,102	Бело-серое пятно без перифокального отека	2
6–9	Мощность 150 мВт, экспозиция 0,1 мс, диаметр пятна 100 мкм	0,19	Белое пятно с перифокальным отеком	2
10	Энергия лазерного импульса 90 мВт, экспозиция 0,08 мс, диаметр пятна 50 мкм	0,37	Белое ватообразное пятно с перифокальным отеком	4

Обнаружены выраженные дистрофические изменения в нейронах ганглионарного слоя в виде набухания перикарионов и появления сморщенных нейронов с пикнотичными ядрами. Кроме того, явления умеренно выраженного перичеллюлярного отека были выявлены во внутреннем ядерном слое, в отдельных случаях – в наружном ядерном слое.

В единичных случаях выявлялись аневризматически расширенные капилляры. Во внутреннем ядерном слое были обнаружены дистрофические изменения в перикарионах нейронов.

Во всех случаях были выявлены признаки выраженного или умеренно выраженного отека в слое палочек и колбочек (рис.).

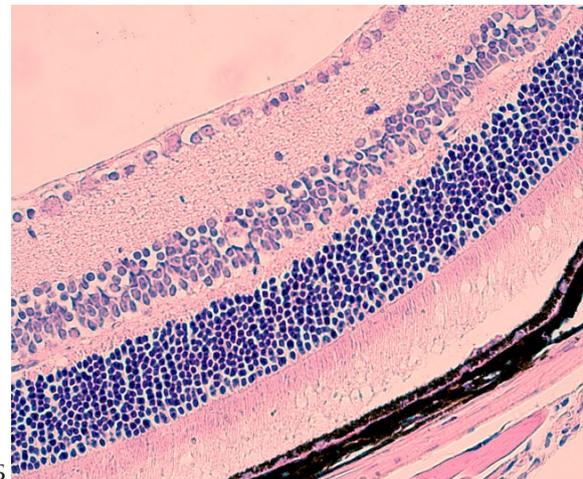
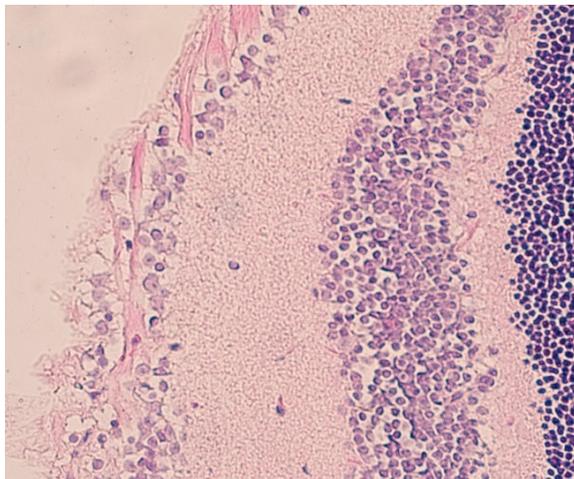


Рис. Гистологическое строение сетчатки глаза мыши на 14-й день после лазерной процедуры. Окраска гематоксилин-эозином. Общее увеличение ×400

Таким образом, через 2 недели при офтальмокопии определялись коагуляты I–IV степени по классификации L'Esperance F. Хориоидальная неоваскуляризация (ХНВ) не выявлена ни в одном из случаев.

Вероятно, для достижения результата модели лазер-индуцированной хориоидальной неоваскуляризации необходимо последовательно, более длительно,

поэтапно оказывать лазерное воздействие с повреждением пигментного эпителия сетчатки до возникновения хориоидальной неоваскуляризации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Повреждение у мышей пигментного эпителия сетчатки лазерным излучением с длиной волны 532 нм

и дозами от 0,05 до 0,37 Вт/см² характеризовалось появлением коагулятов I–IV степеней по классификации L'Esperance F без признаков хориоидальной неоваскуляризации.

Гистологически у подопытных животных развивались выраженные дистрофические изменения

в нейронах ганглионарного слоя сетчатки, что сопровождалось явлениями отека, наиболее выраженным в слое нервных волокон, ганглионарном слое и в слое палочек и колбочек без признаков роста хориоидальной неоваскуляризации.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Янгиева Н.Р., Туйчибаева Д.М., Агзамова С.С., Абасханова Н.Х. Оценка состояния организации офтальмологической помощи пациентам с возрастной макулярной дегенерацией в первичном звене здравоохранения. *Офтальмология. Восточная Европа*. 2024;14(2):250.

2. Марковец А.М., Колосова Н.Г. Возрастная макулярная дегенерация и участие фактора роста сосудистого эндотелия в ее патогенезе. *Российский офтальмологический журнал*. 2009;2(3):51–58.

3. Файзрахманов Р.Р., Босов Э.Д., Богданова В.А. и др. Морфофункциональные особенности пигментного эпителия сетчатки в норме и при возрастной макулярной дегенерации. Обзор литературы. *Офтальмология*. 2024;21(1):44–50.

4. Lambert V., Lecomte J., Hansen S. et al. Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice. *Nature protocols*. 2013;8(11):2197–2211.

5. Latendresse J.R., Warbritton A.R., Jonassen H. fixation of testes and eyes using a modified davidson's fluid: comparison with bouin's fluid and conventional davidson's fluid. *Toxicologic pathology*. 2002;30(4):524–533.

6. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника: руководство. М.: Медицина, 1996. 544 с.

REFERENCES

1. Yangieva N.R., Tuychibaeva D.M., Agzamova S.S., Abaskhanova N.Kh. Assessment of the state of organization of ophthalmological care for patients with age-related macular degeneration in primary health care. *Oftal'mologiya. Vostochnaya Evropa = Ophthalmology. Eastern Europe*. 2024;14(2):250. (In Russ.).

2. Markovets A.M., Kolosova N.G. Age-related macular degeneration and participation of vascular endothelial growth factor in its pathogenesis. *Rossiiskii oftal'mologicheskii zhurnal = Russian Ophthalmological Journal*. 2009;2(3):51–58. (In Russ.).

3. Fayzrakhmanov R.R., Bosov E.D., Bogdanova V.A. et al. Morphofunctional features of the retinal pigment epithelium in norm and in age-related macular degeneration. Literature review. *Oftal'mologiya = Ophthalmology*. 2024;21(1):44–50. (In Russ.).

4. Lambert V., Lecomte J., Hansen S. et al. Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice. *Nature protocols*. 2013;8(11):2197–2211.

5. Latendresse J.R., Warbritton A.R., Jonassen H. fixation of testes and eyes using a modified davidson's fluid: comparison with bouin's fluid and conventional davidson's fluid. *Toxicologic pathology*. 2002;30(4):524–533.

6. Sarkisov D.S., Perov Yu.L. Microscopic technique. Manual. Moscow: Medicine, 1996. 544 p. (In Russ.).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Информация об авторах

Сергей Владимирович Иванов – кандидат медицинских наук, директор, Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Фёдорова, Волгоградский филиал, Волгоград, Россия; mntk@isee.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6303-9493>

Юлия Юрьевна Хзарджан – кандидат медицинских наук, заведующая офтальмологическим отделением лазерной хирургии, Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Фёдорова, Волгоградский филиал, Волгоград, Россия; mntk@isee.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2996-5960>

Алексей Владимирович Смирнов – доктор медицинских наук, заведующий кафедрой патологической анатомии, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-5351-6105>

Людмила Владимировна Науменко – доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии и биоинформатики, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; milanaumenko@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2119-4233>

Алена Сергеевна Таран – кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии и биоинформатики, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-8477-254X>

Алина Михайловна Чебанько – ассистент кафедры фармакологии и биоинформатики, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; <https://orcid.org/0009-0004-3140-5040>

Мария Александровна Балалина – врач-офтальмолог офтальмологического отделения лазерной хирургии, Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Фёдорова, Волгоградский филиал, Волгоград, Россия; mntk@isee.ru

Виктория Вячеславовна Чубарикова – врач-офтальмолог офтальмологического отделения лазерной хирургии, Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Фёдорова, Волгоградский филиал, Волгоград, Россия; mntk@isee.ru

Максим Александрович Коротков – врач-офтальмолог офтальмологического отделения лазерной хирургии, Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Фёдорова, Волгоградский филиал, Волгоград, Россия; mntk@isee.ru

Ирина Владимировна Соловьева – врач-офтальмолог офтальмологического отделения лазерной хирургии, Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Фёдорова, Волгоградский филиал, Волгоград, Россия; mntk@isee.ru

Статья поступила в редакцию 14.01.2025; одобрена после рецензирования 20.02.2025; принята к публикации 26.03.2025.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Information about the authors

Sergey V. Ivanov – Candidate of Medical Sciences, Director, Academician S.N. Fedorov Eye Microsurgery, Volgograd Branch, Volgograd, Russia; [✉] mntk@isee.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6303-9493>

Yulia Yu. Khzardzhan – Candidate of Medical Sciences, Head of the Ophthalmological Department of Laser Surgery, Academician S.N. Fedorov Eye Microsurgery, Volgograd Branch, Volgograd, Russia; mntk@isee.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2996-5960>

Alexey V. Smirnov – MD, Head of the Department of Pathological Anatomy, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-5351-6105>

Lyudmila V. Naumenko – MD, Professor, Department of Pharmacology and Bioinformatics, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; milanaumenko@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2119-4233>

Alena S. Taran – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmacology and Bioinformatics, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-8477-254X>

Alina M. Chebanko – Assistant Professor at the Department of Pharmacology and Bioinformatics, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; <https://orcid.org/0009-0004-3140-5040>

Maria A. Balalina – Ophthalmologist at the Ophthalmological Department of Laser Surgery, Academician S.N. Fedorov Eye Microsurgery, Volgograd Branch, Volgograd, Russia; mntk@isee.ru

Victoria V. Chubarikova – Ophthalmologist at the Ophthalmological Department of Laser Surgery, Academician S.N. Fedorov Eye Microsurgery, Volgograd Branch, Volgograd, Russia; mntk@isee.ru

Maxim A. Korotkov – Ophthalmologist at the Ophthalmological Department of Laser Surgery, Academician S.N. Fedorov Eye Microsurgery, Volgograd Branch, Volgograd, Russia; mntk@isee.ru

Irina V. Solovyova – Ophthalmologist at the Ophthalmological Department of Laser Surgery, Academician S.N. Fedorov Eye Microsurgery, Volgograd Branch, Volgograd, Russia; mntk@isee.ru

The article was submitted 14.01.2025; approved after reviewing 20.02.2025; accepted for publication 26.03.2025.