

stowych, z których następnie korzysta się w taki sam sposób, jak z protokołów „firmowych”. Kreowanie nowych protokołów nie wymaga znajomości żadnych języków programowania; sprowadza się ono do wypełnienia wyświetlanych na ekranie tabel liczbami i symbolami, wybieraniem spośród podawanych przez komputer metod (dotyczą one warunków stymulacji i parametrów toru rejestracji w poszczególnych krokach procedur testowych). Ponadto można we „własnym” protokole zapisać komentarz, np. w postaci wskazówek pomocnych w przygotowaniu badania (rodzaj i czas adaptacji pacjenta, rozmieszczenie elektrod i sposób ich przylączenia do poszczególnych kanałów itp.).

Korzystając z tej dogodnej drogi dostosowania systemu do potrzeb kliniki, opracowano szereg nowych protokołów testowych, np.: równoczesna rejestracja ERG i VER, zapis potencjałów oscylacyjnych poprzez odfiltrowanie ich z ERG, badanie wpływu kontrastu oraz czułości przestrzennej bodźca typu *pattern* na VER, test oślnienia<sup>2</sup> (badanie wpływu oślnienia na odpowiedzi elektryczne siatkówki i kory wzrokowej), procedury badań na zwierzętach doświadczalnych i inne. Część tych protokołów jest wykorzystywana w pracach naukowych, niektóre z nich są już rutynowo stosowane jako testy kliniczne, inne wymagają dopracowania i zmian.

Obecnie zespół kliniki opracowuje metodykę kolejnych testów, np. w fazie eksperymentalnej znajduje się test EOG modyfikowany działaniem środków hiperosmotycznych, który pozwoli na ocenę uszkodzeń warstwy barwnikowej. Przygotowywane są testy z zastosowaniem stymulacji diodami elektroluminescencyjnymi (bodźce typu błysk oraz *pattern*), ważne szczególnie w badaniach noworodków i przy przedoperacyjnej ocenie stanu funkcjonalnego układu wzrokowego, w przypadkach ciężkich uszkodzeń oka. Odrębny pakiet testów, opartych na metodzie przedstawionej uprzednio<sup>3</sup>, będzie służył badaniom mechanizmów widzenia barwnego.

Zaprezentowane pokrótce przedsięwzięcia zmierzające do zwiększenia zakresu zastosowań systemu nie wyczer-

pują, jak się wydaje, wszystkich potencjalnych możliwości tego zestawu. Jako system oparty na oprogramowaniu może on, w porównaniu z urządzeniami specjalizowanymi, stosunkowo łatwo nadążać za zmianami wymagań związanymi z postępem w dziedzinie metod diagnostycznych<sup>4</sup>. Mimo pewnych wad i braków (o najważniejszych z nich była już mowa) UTAS-E1000 jest bardzo przydatny zarówno w naukowych pracach eksperymentalnych, jak i w elektrodiagnostyce szeregu schorzeń układu wzrokowego, wśród których można wymienić: zwyrodnienia tapetoretinalne, schorzenia plamki, metalozy, zaburzenia krążenia w siatkówce, odwarstwienia siatkówki i wysoką krótkowzroczność, zaburzenia widzenia barwnego, niektóre intoksykacje, choroby demielizacyjne, choroby nerwu wzrokowego, urazy czaszki, inne zmiany i zaburzenia siatkówkowe. Ważną rolę odgrywają też badania funkcji układu wzrokowego u noworodków oraz przedoperacyjne badania tych funkcji przy nieprzezroczystych ośrodkach optycznych.

Zdaniem autorów wyposażenie w tego rodzaju aparaturę przynajmniej wiodących ośrodków zajmujących się elektrodiagnostyką układu wzrokowego jest ze wszystkich celów i uzasadnione. Doniesienia o powstających w kraju opracowaniach systemów komputerowego wspomaganiania badań elektrofizjologicznych pozwalają żywić nadzieję, że w dziedzinie okulistyki kierunek ten będzie się także i u nas dynamicznie rozwijał.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Carr R. E., Siegel I. M.: Visual Electrodiagnostic Testing. (Williams and Wilkins, Baltimore 1982).
2. Palacz O.: Test oślnienia w elektroretinografii jako nowa dynamiczna metoda badań. Klin. oczna 86: 107—108 (1984).
3. Penkala K.: Korowe odpowiedzi wywołane bodźcem w postaci skokowej zmiany składu widmowego światła, 213—214 II Krajowa Konferencja Naukowa „Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna”, Gliwice, 1978.
4. Penkala K.: Skomputeryzowana aparatura elektrodiagnostyczna dla okulistyki. Probl. Techn. Med. 18: 21—28 (1987).

Praca wpłynęła: 26.4.1987 (nr 5141).

MAREK PROST

## Metody badania czynności nacyniotwórczej siatkówki

METHODS OF EXAMINATION OF THE ANGIOGENIC ACTIVITY OF THE RETINA

The author presents the possibilities of examination of the angiogenic activity of the retina; he presents also his own system of the quantitative evaluation of the vascular proliferation by the methods of implantation into a corneal pocket or implantation on the chorioallantoic membrane.

HASŁA: czynność nacyniotwórcza siatkówki, metody badania, wszczepianie do kieszonki rogówkowej, implantacja na błonę kosmówkowo-omocznioową  
KEY WORDS: angiogenic activity of the retina, methods of examination, implantation into corneal pocket, implantation on the chorioallantoic membrane

i współpr.<sup>5</sup>. Polega ona na wykonaniu liniowego nacięcia rogówki o długości 3 mm w odległości 4—5 mm od rąbka. Następnie rozwarstwia się rogówkę do linii oddalonej 1 mm od rąbka. W każdym oku wykonuje się dwie kieszonki uważając, aby nie znalazły się one w osi mięśni prostych, ze względu na bogatsze unaczynienie twardówki w tych miejscach<sup>2</sup>. W kieszonkach tych umieszczano następnie badane wycinki siatkówki.

W ciągu pierwszych dni po wszczepieniu tkanki można było zaobserwować rozszerzenie naczyń w rąbku na przeciw kieszonki. W 4—5 dniu w rogówce zaczynały się pojawiać pierwsze wnikające naczynia rąbkowe. Po 7—8 dniach przekraczały one pas rogówki szerokości 1 mm oddzielający kieszonkę od rąbka i zaczynały wnikać do wszczepionej tkanki. Maksymalny ich wzrost obserwowano po 12 dniach. Od 21 dnia widoczny był powolny zanik proliferujących naczyń w rogówce.

Ocenę wnikaną naczyń do rogówki kota przeprowadzono po 14 dniach ponieważ w tym okresie we wszystkich przypadkach dochodziło do ich maksymalnego wzrostu. Nasilenie wnikaną naczyń do rogówki określano w oparciu o czterostopniową skalę. Opracowano ją na podstawie obserwacji rogówek, do których wszczepiano stopniowo coraz większe wycinki siatkówki zawierającej czynniki nacyniotwórcze oraz na podstawie analizy przepuszczalnej dyfuzji tych substancji w rogówce.

Po wszczepieniu do kieszonki tkanki zawierającej czynniki nacyniotwórcze zaczynają one dyfundować w rogówce. Po osiągnięciu rąbka powodują proliferację znajdujących się tam naczyń. Jak wiadomo naczynia te rozrastają się w kierunku miejsca największej koncentracji czynników nacyniotwórczych, zaś stopień ich proliferacji zależy od stężenia tych czynników<sup>2</sup>. W przypadku kieszonki rogówkowej czynniki nacyniotwórcze osiągają najszybciej i w największym stężeniu naczynia rąbkowe położone naprzeciw kieszonki, od której oddzielone są tylko jednocentymetrowym pasmem nierozwarstwiającej rogówki. Dlatego też przy małym stężeniu tych czynników naczynia powinny rozwijać się tylko w obrębie kieszonki. Czynniki te dyfundują także do rogówki przylegającej z boku do kieszonki. Do osiągnięcia położonych bocznie od kieszonki naczyń rąbka potrzebne są jednak większe stężenia ponieważ naczynia

PRZYCZYNY neowaskularyzacji siatkówkowej nie są jeszcze dokładnie poznane. Dlatego też na całym świecie prowadzone są liczne prace badawcze, których duża część poświęcona jest budowie, mechanizmowi produkcji i uwalniania oraz działaniu czynników nacyniotwórczych. Obecność tych czynników w tkankach oka może być w chwili obecnej badana za pomocą czterech metod: wszczepiania do kieszonki rogówkowej, implantacji na błonę kosmówkowo-omocznioową zarodków kurzych, obserwacji stymulacji wzrostu komórek śródbłonka w hodowli tkankowej oraz badania stymulacji aktywności prokolagenazy.

Pierwsza z tych metod, polegająca na ocenie wnikaną naczyń rąbka do kieszonki rogówki z wszczepioną tkanką (lub polimerem zawierającym wyciąg z tkanek), jest najprostszą i najłatwiejszą do oceny ze względu na brak naczyń w rogówce. Wszczepienie obcej gatunkowo tkanki może być jednak czasami przyczyną odczynów immunologicznych<sup>3</sup>.

W drugiej metodzie, w której bada się reakcję naczyń błony kosmówkowo-omocznioowej wokół wszczepionej tkanki, odczyn immunologiczny nie występuje, ponieważ zarodek kurzy nie ma zdolności produkcji przeciwciał do 14 dnia życia. W metodzie tej ocena wyników jest nieco trudniejsza, ponieważ neowaskularyzacja ma miejsce w już unaczynionej tkance.

Inną metodą jest obserwacja stymulacji wzrostu komórek śródbłonka w hodowli tkankowej, do której dodaje się wyciąg z badanej tkanki. W chwili obecnej nie wiemy jednak, czy reakcja wyizolowanych komórek śródbłonka odpowiada reakcji śródbłonka w naczyniach<sup>4</sup>.

Ostatnio zaproponowano, aby czynność nacyniotwórczą tkanek miarzyć za pomocą oceny stymulacji aktywności prokolagenazy<sup>5</sup>. Stwierdzono mianowicie, że czynniki nacyniotwórcze powodują także aktywację prokolagenazy. Ma to na celu degradację kolagenowej substancji pozakomórkowej w celu swobodnego rozwoju proliferujących naczyń. Metoda ta została wprowadzona do badania czynności nacyniotwórczej tkanek oka w r. 1986 i dlatego trudno jest jeszcze dokonać jej oceny.

Śród wymienionych metod najczęściej stosowane są wszczepienie do kieszonki rogówkowej i implantacja na błonę kosmówkowo-omocznioową zarodka kurzego<sup>1—6, 8, 12, 13</sup>. W metodach tych brak było jednak opracowanych szczegółowo kryteriów pozwalających na ilościową ocenę proliferujących naczyń w rogówce i błonie kosmówkowo-omocznioowej. Wyniki testów określano zazwyczaj jako pozytywne lub negatywne<sup>6, 7</sup>. Niektórzy autorzy stosowali kilkustopniowe kryteria oceny wzrostu naczyń, lecz były one mało dokładne<sup>4, 8, 13</sup>.

Celem niniejszej pracy było przedstawienie własnych systemów ilościowej oceny proliferacji naczyń w metodach wszczepiania do kieszonki rogówkowej i implantacji na błonę kosmówkowo-omocznioową, które stosowane są w naszej klinice w badaniach nad obecnością czynników nacyniotwórczych tkanek oka.

Ocena obecności czynników nacyniotwórczych w siatkówce po ich wszczepieniu do rogówki

Wszczepianie badanych tkanek do rogówki kota wykonywano zgodnie z techniką podaną przez Gimbrone

Z Kliniki Okulistycznej AM w Lublinie, kierownik: prof. dr med. Kazimierz Gerkowicz

Reprint requests to: Doc. dr med. Marek Prost, ul. Chmielna 1; 20-612 Lublin, Poland

te są oddzielone szerszym pasmem nierozwarstwionej rogówki.

Przeprowadzone badania doświadczalne, polegające na wszczępieniu coraz większych wycinków siatkówki, wykazały słusność przedstawionych powyżej rozważań. Przy wszczępieniu małych wycinków naczyń rąbkowe rozrastały się tylko w obrębie kieszonki, zaś przy większych rozwijały się także w częściach rogówki położonych z boku kieszonki.



Ryc. 1. 2° neowaskularyzacji po wszczępieniu siatkówki do kieszonki rogówkowej.



Ryc. 2. 4° neowaskularyzacji po wszczępieniu siatkówki do kieszonki rogówkowej.

Zgodnie z tymi rozważaniami i wynikami badań doświadczalnych opracowano 4-stopniową skalę. Poszczególne jej stopnie odpowiadały następującym zmianom w rogówce: 1) w obrębie kieszonki widoczne są pojedyncze naczynia, których liczba nie przekracza pięciu; 2) liczba wnikaających naczyń jest większa niż pięć, przy czym znajdują się one tylko na obszarze, gdzie wykonano uprzednio kieszonkę (ryc. 1), 3) w porównaniu ze stopniem 2 stwierdza się dalsze zwiększenie liczby naczyń, które rozrastają się także w przylegających bezpośrednio z boku do kieszonki częściach rogówki; 4) w rogówce widoczne są liczne wnikające naczynia, również w częściach poza kieszonką. Szerokość frontu wnikających naczyń jest ponad dwukrotnie większa niż szerokość samej kieszonki w rogówce (ryc. 2).

Ocena obecności czynników naczyniotwórczych w siatkówce po ich implantacji na błonę kosmówkowo-omocznioową zarodków kurzych

Wszczepienie badanych tkanek lub też wyciągów z nich przeprowadzono według techniki Luttýego i współpracowników. W tym celu w skorupce 6-dniowych zarodków kurzych wycinano okienko uwidaczniając błonę kosmówkowo-omocznioową. Zarodki inkubowano następnie przez 2 dni. Na ósmy dzień w części błony nie zawierającej naczyń wykonywano nakłucia i następnie w miejsce to implantowano badany wycinek siatkówki. Zarodek inkubowano przez dalsze 6 dni.

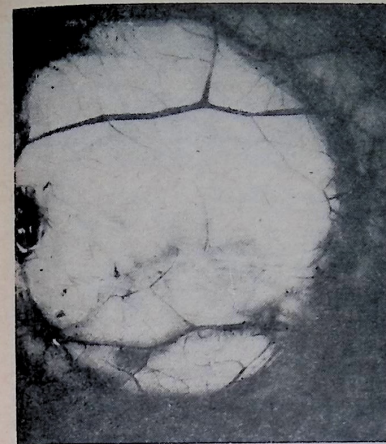
Wszczepienie tkanek zawierających czynniki naczyniotwórcze powoduje koncentryczne, promieniste wnikaanie naczyń błony kosmówkowo-omocznioowej do implantu. Ocenę stopnia wrastania naczyń przeprowadzono w oparciu o 4-stopniową skalę. Opracowano ją na podstawie obserwacji błon kosmówkowo-omocznioowych, do których implantowano stopniowo coraz większe wycinki siatkówki. Obserwacje te pozwoliły na stwierdzenie, że stężenie czynników naczyniotwórczych powoduje odczyn początkowo ze strony małych naczyń błony, a następnie średnich i dużych. Dlatego też przy opracowaniu schematu oceny neowaskularyzacji błony kosmówkowo-



Ryc. 3. 1° neowaskularyzacji po wszczępieniu siatkówki na błonę kosmówkowo-omocznioową.



Ryc. 4. 2° neowaskularyzacji po wszczępieniu siatkówki na błonę kosmówkowo-omocznioową.



Ryc. 5. 3° neowaskularyzacji po wszczępieniu siatkówki na błonę kosmówkowo-omocznioową.



Ryc. 6. 4° neowaskularyzacji po wszczępieniu siatkówki na błonę kosmówkowo-omocznioową.

-omocznioowej wzięto pod uwagę nie tylko liczbę wnikaających naczyń, ale także ich kaliber.

Poszczególne stopnie tej skali odpowiadały następującym zmianom: 1) widoczne jest koncentryczne wnikaanie niewielkich naczyń błony do wszczępionej tkanki, przy czym zmiany nie zajmują w sumie więcej niż dwa

kwadranty (ryc. 3); 2) wrastające małe naczynia obserwuje się we wszystkich kwadrantach błony otaczającej wszczępioną tkankę. Obserwuje się także niewielkie zmiany w przebiegu średnich naczyń (ryc. 4); 3) do implantu zaczynają wrastać także średnie naczynia błony (ryc. 5); 4) widoczne jest koncentryczne wnikaanie do wszczępionej tkanki dużych naczyń błony, które często tworzą poszerzone pętle w centrum zmiany (ryc. 6).

Przedstawione powyżej systemy oceny proliferacji naczyń rąbka rogówki i błony kosmówkowo-omocznioowej są stosowane w pracach dotyczących czynności naczyniotwórczej tkanek oka prowadzonych w naszej klinice<sup>10, 11</sup>, a ich wprowadzenie pozwoliło na dokładniejszą ilościową ocenę występowania czynników naczyniotwórczych w badanych tkankach.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Ausprunk D. H., Knighton D. R., Folkman J.: Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois. *Amer. J. Pathol.* 79: 597—618 (1975).
2. Ben Ezra D.: Neovascularogenesis. Triggering factors and possible mechanism. *Surv. Ophthalmol.* 24: 167—176 (1979).
3. Chen S. C.: Angiogenic activity of vitreous and retinal extracts. *Invest. Ophthalmol.* 19: 596—602 (1980).
4. Federman J. L., Brown G. C., Feldberg N. T., Felton S. M.: Experimental ocular angiogenesis. *Amer. J. Ophthalmol.* 89: 231—237 (1980).
5. Gimbrowe M. A., Leapman S. B., Cotran R. S., Folkman J.: Tumor growth and neovascularization: An experimental model using the rabbit cornea. *J. Natl. Cancer Inst.* 52: 413—427 (1974).
6. Glaser D. M., D'Amore P. A., Michels R. C., Brunson S. K., Fenselau A. H., Rice T., Patz A.: The demonstration of angiogenic activity from ocular tissues. *Ophthalmology* 87: 440—445 (1980).
7. Kissun R. D., Hill C. R., Garner A., Phillips P., Kumar S., Weiss J. B.: A low-molecular-weight angiogenic factor in cat retina. *Brit. J. Ophthalmol.* 66: 165—169 (1982).
8. Kissun R. D., Garner A.: Vasoformative properties of normal and hypoxic retinal tissue. *Brit. J. Ophthalmol.* 61: 394—398 (1977).
9. Luttý G. A., Thompson D. C., Gallup J. Y., Mallo R. J., Patz A., Fenselau A.: Vitreous: An inhibitor of retinal extract induced neovascularization. *Invest. Ophthalmol.* 23: 52—56 (1983).
10. Prost M.: Badania doświadczalne nad patogenezą i możliwością leczenia retinopatii wcześniaków. Praca habilitacyjna. (AM, Lublin 1985).
11. Prost M.: Experimental studies on the pathogenesis of the retinopathy of prematurity. *Brit. J. Ophthalmol.* 72: 363—367 (1988).
12. Shahabuddin S., Kumar S.: Quantitation of angiogenesis factor in bovine retina and tumor extracts by means of radioimmunoassay. *Brit. J. Ophthalmol.* 67: 286—291 (1983).
13. Taylor C. M., Weiss J. B., Kissun R. D., Garner A.: Effect of oxygen tension on quantities of procollagenase activating angiogenic factor present in the developing kitten retina. *Brit. J. Ophthalmol.* 70: 162—165 (1986).

Praca wpłynęła: 17.4.1987 (nr 5131).