

**Εξωαγγειακές προσεγγίσεις για τη λύση του θρόμβου  
σε απόφραξη φλέβας του αμφιβληστροειδή:  
πειραματική και κλινική μελέτη**

Διδακτορική Διατριβή  
Του  
**Εμμανουήλ Β. Χριστοδουλάκη**  
Οφθαλμίατρο

Επιβλέπων: Μιλτιάδης Κ. Τσιλιμπάρης  
Επικ. Καθηγητής Οφθαλμολογίας

Συνεπιβλέποντες: Ιωάννης Γ. Παλλήκαρης  
Καθηγητής Οφθαλμολογίας

Αστέριος Κατσαμούρης  
Καθηγητής Αγγειοχειρουργικής

**Εξωαγγειακές προσεγγίσεις για τη λύση του θρόμβου σε  
απόφραξη φλέβας του αμφιβληστροειδή: πειραματική  
και κλινική μελέτη**

---

**ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ Β. ΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΑΚΗ, ΟΦΘΑΛΜΙΑΤΡΟΥ**

Επιμελήτη Οφθαλμολογικής Κλινικής Γ. Ν. Ρεθύμνου

*Διδακτορική Διατριβή*

**Επιβλέπων:** Μιλτιάδης Κ. Τσιλιμπάρης, Επικ. Καθηγητής Οφθαλμολογίας

**Συνεπιβλέποντες:** Ιωάννης Γ. Παλλήκαρης, Καθηγητής Οφθαλμολογίας  
Αστέριος Κατσαμούρης, Καθηγητής Αγγειοχειρουργικής

**Μέλη 7 μελούς:** Παναγιώτης Βάρδας, Καθηγητής Καρδιολογίας  
Σοφία Αντιμησιάρη, Αναπλ. Καθηγήτρια Φαρμακολογίας  
Γεώργιος Βελεγράκης, Αναπλ. Καθηγητής ΩΡΛ  
Χαράλαμπος Σιγανός, Επικ. Καθηγητής Οφθαλμολογίας

---

ΤΟ ΕΡΓΟ ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΘΗΚΕ ΑΠΟ ΤΟ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ  
ΤΗΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ "ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ -  
Υποτροφίες Έρευνας με προτεραιότητα στη Βασική Έρευνα" του ΕΠΕΑΕΚ II

---

**Ηράκλειο, Δεκέμβριος 2007**

*στους δασκάλους μου*

*στην οικογένειά μου*



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κατάλογος Εικόνων.....	vii
Κατάλογος Πινάκων.....	ix
Ευχαριστίες.....	xi
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
<b>A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>3</b>
1. Ανατομική θεώρηση.....	4
Αιματοαμφιβληστροειδικός Φραγμός.....	10
2. Το πρόβλημα: Η θρόμβωση της φλέβας του αμφιβληστροειδή.....	16
2.1. Επιδημιολογία – Παθοφυσιολογία – Κλινική Πορεία.....	20
2.1.1. Θρόμβωση κεντρικής φλέβας.....	20
2.1.2. Θρόμβωση κλάδου φλέβας.....	21
2.2. Θεραπείες.....	23
2.2.1. Για θρόμβωση κεντρικής φλέβας.....	23
2.2.2. Για κλαδική θρόμβωση φλέβας.....	28
3. Θρόμβωση.....	30
3.1. Μηχανισμοί θρόμβωσης.....	30
3.2. Σύσταση του θρόμβου.....	31
3.3. Εξέλιξη των θρόμβων.....	31
4. Θρομβόλυση.....	32
4.1. Ενδοϋαλοειδικές ενέσεις.....	35
4.1.1. Προβλήματα που σχετίζονται με τις ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις.....	36
5. Συστήματα Παρατεταμένης Χορήγησης Φαρμάκων.....	38
5.1. Λιποσώματα.....	39
5.1.1. Ορισμοί.....	39
5.1.2. Ιδιότητες.....	39
5.1.3. Αλληλεπίδραση λιποσωμάτων – κυττάρων.....	42
<b>B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>46</b>
1. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	47
1.1. ΚΛΙΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	48
Σκοπός.....	48
1.1.1. Το φάρμακο.....	48
1.1.2. Οι ασθενείς.....	49
1.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	52
1.2.1. Πειραματόζωα.....	52
1.2.2. Το Πειραματικό Μοντέλο Θρόμβωσης.....	55
1.2.3. Το Laser.....	55
1.2.4. Ο Θρομβολυτικός Παράγοντας (t-PA, Actilyse).....	56
1.2.5. Ενκαψλίωση – εγκλωβισμός t-PA σε λιποσώματα.....	57
1.2.6. Αξιολόγηση.....	59
1.2.7. Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF).....	62
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	63
2.1. ΚΛΙΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	63
2.1.1. Ασθενείς με θρόμβωση κλάδου φλέβας αμφιβληστροειδή.....	63
2.1.2. Ασθενείς με θρόμβωση κεντρικής φλέβας αμφιβληστροειδή.....	67
2.1.3. Συζήτηση.....	73
2.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	78
2.2.1. Πείραμα 1.....	79
2.2.2. Πείραμα 2.....	90

2.2.3. Πείραμα 3.....	96
2.2.4. Πείραμα 4.....	98
2.2.5. Πείραμα 5.....	103
2.2.6. Πείραμα 6.....	112
2.2.7. Σύνοψη – Συζήτηση.....	118
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	121
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	124
SUMMARY.....	126
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	128
1. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ – ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ.....	139
2. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	165

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

### ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

<u>Εικόνα 1.</u> Οφθαλμική αρτηρία και κόγχος	σελ 5
<u>Εικόνα 2.</u> Αρτηριακή-φλεβική κυκλοφορία οπτικού δίσκου-οπτικού νεύρου	σελ 6
<u>Εικόνα 3.</u> Φυσιολογικός αμφιβληστροειδής	σελ 7
<u>Εικόνα 4.</u> Φλεβική παροχέτευση δεξιού κόγχου	σελ 8
<u>Εικόνα 5.</u> Χοριοειδική κυκλοφορία σε λοβίδια	σελ 9
<u>Εικόνα 6.</u> Διαγραμματική απεικόνιση της κυκλοφορίας του χοριοειδή	σελ 10
<u>Εικόνα 7.</u> Θυριδωτά τριχοειδή του χοριοειδή	σελ 11
<u>Εικόνα 8.</u> Μη θυριδωτά τριχοειδή του αμφιβληστροειδή	σελ 12
<u>Εικόνα 9.</u> Διάγραμμα αιμάτωσης του νευροαισθητήριου αμφιβληστροειδή	σελ 13
<u>Εικόνα 10.</u> Οι στιβάδες του αμφιβληστροειδή	σελ 15
<u>Εικόνα 11.</u> Μη ισχαιμική θρόμβωση κεντρικής φλέβας (φωτογραφία)	σελ 16
<u>Εικόνα 12.</u> Μη ισχαιμική θρόμβωση κεντρικής φλέβας(φλουροαγγειογραφία)	σελ 17
<u>Εικόνα 13.</u> Ισχαιμική θρόμβωση κεντρικής φλέβας (φωτογραφία)	σελ 17
<u>Εικόνα 14.</u> Ισχαιμική θρόμβωση κεντρικής φλέβας (φλουροαγγειογραφία)	σελ 18
<u>Εικόνα 15.</u> Θρόμβωση κλάδου φλέβας αμφιβληστροειδούς (φωτογραφία)	σελ 18
<u>Εικόνα 16.</u> Θρόμβωση κλάδου φλέβας αμφ/δούς (φλουροαγγειογραφία)	σελ 19
<u>Εικόνα 17.</u> Το ινωδολυτικό σύστημα	σελ 33
<u>Εικόνα 18.</u> Οι ενδοϋαλοειδικές ενέσεις	σελ 36
<u>Εικόνα 19.</u> Αλληλεπίδραση λιποσωμάτων – κυττάρων	σελ 42
<u>Εικόνα 20.</u> Φωτογραφίες από πειράματα	σελ 54-55
<u>Εικόνα 21.</u> Φωτογραφία από μονόστιβα λιποσώματα	σελ 58

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

<u>Εικόνα 1.</u> Ασθενής 1 με κλαδική θρόμβωση αμφιβληστροειδή	σελ 64-65
<u>Εικόνα 2.</u> Ασθενής 4 με θρόμβωση κεντρικής φλέβας αμφιβληστροειδή	σελ 68-69
<u>Εικόνα 3.</u> Ασθενής 6 με θρόμβωση κεντρικής φλέβας αμφιβληστροειδή	σελ 71

<u>Εικόνα 4.</u> (σχήμα) 2 laser spots, σε αυτί κουνελιού	σελ 80
<u>Εικόνα 5.</u> Φωτογραφία κατά τη διαφανοσκόπηση	σελ 80
<u>Εικόνα 6-7.</u> Ιστολογία (φωτονική μικροσκοπία) πειράματος 2.2.1.3.	σελ 82
<u>Εικόνα 8-11.</u> Ιστολογία (φωτονική μικροσκοπία) πειράματος 2.2.1.4.	σελ 85-86
<u>Εικόνα 12-13.</u> Ανοσοϊστοχημεία πειράματος 2.2.1.5.	σελ 89
<u>Εικόνα 14.</u> Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ακτινοβολήσης	σελ 91
<u>Εικόνα 15.</u> Ιστολογία (φωτονική μικροσκοπία) πειράματος 2.2.2.4.	σελ 96
<u>Εικόνα 16.</u> Φωτογραφία βυθού και φλουροαγγειογραφία (πείραμα 2.2.4.2)	σελ 102
<u>Εικόνα 17-18.</u> Οπτική τομογραφία συνοχής (πείραμα 2.2.5.1.)	σελ 107-108
<u>Εικόνα 19-21.</u> Ιστολογία (φωτονική μικροσκοπία) πειράματος 2.2.5.1.	σελ 109
<u>Εικόνα 22.</u> Ανοσοϊστοχημεία πειράματος 2.2.5.2.	σελ 111
<u>Εικόνα 23-24.</u> Ανοσοϊστοχημεία πειράματος 2.2.6.2.	σελ 114



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<u>Πίνακας 1.</u> Λιποσωμιακά μοντέλα και διαφορετικά μοντέλα λιποσωμάτων : μέγεθος και μορφολογία	σελ 40
<u>Πίνακας 2.</u> Εμπορικά σκευάσματα σε λιποσώματα	σελ 43
<u>Πίνακας 3.</u> Αποτελέσματα μετρήσεων ισχύος εξόδου του διοδικού laser	σελ 56
<u>Πίνακας 4.</u> Στοιχεία ασθενών με κλαδική θρόμβωση φλέβας	σελ 66
<u>Πίνακας 5.</u> Στοιχεία ασθενών με θρόμβωση κεντρικής φλέβας	σελ 74
<u>Πίνακας 6.</u> Αποτελέσματα πειράματος 2.2.4.2.	σελ 101
<u>Πίνακας 7.</u> Αποτελέσματα πειράματος 2.2.5.1.(μέθοδος 2)	σελ 106
<u>Πίνακας 8.</u> Αποτελέσματα πειράματος 2.2.6.3.	σελ 116



## Ευχαριστίες

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους δασκάλους μου κ. Ιωάννη Παλλήκαρη, Καθηγητή Οφθαλμολογίας, και κ. Μιλτιάδη Τσιλιμπάρη, Επικ. Καθηγητή Οφθαλμολογίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια και για την επιλογή του θέματος που θα αναπτύξω παρακάτω.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον κ. Τσιλιμπάρη, για την στήριξη όλα αυτά τα χρόνια στις ερευνητικές προσπάθειες, την άοκνη διάθεση για βοήθεια, τον πάντα διαθέσιμο χρόνο για κάθε ουσιώδες και την επίπονη πολλές φορές ηθική υποστήριξη, από τα πρώτα βήματα της ειδίκευσης, μέχρι σήμερα.

Την κ. Σοφία Αντιμησιάρη, Αναπλ. Καθηγήτρια του Φαρμακευτικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Πάτρας, για τη συμμετοχή της στην παρασκευή και ανάπτυξη των λιποσωμάτων, του εγκλωβισμού του tPA σε λιποσώματα, αλλά και την επιστημονική και ηθική βοήθεια στην εξέλιξη της μελέτης.

Την κ. Eleonora Grigoryan, Καθηγήτρια Βιολογίας του Ινστιτούτου Koltzov της Ρωσικής Ακαδημίας Επιστημών (Μόσχα), για την πολύτιμη βοήθειά της στην ανοσοϊστοχημεία που αναπτύσσεται στην διατριβή.

Την κ. Ειρήνη Ναουμίδα, Βιολόγο, του Ινστιτούτου Οπτικής και Όρασης, για την ανεκτίμητη βοήθεια στην εκτέλεση και εκτίμηση της φωτονικής μικροσκοπίας αυτού του έργου.

Την κ. Βασιλεία Μανιαδή, Ιατρική Φωτογράφο του Τμήματος Ιατρικής Φωτογραφίας της Οφθαλμολογικής Κλινικής του Πα.Γ.Ν.Η, για την βοήθεια στην φωτογραφία βυθού, φλουροαγγειογραφία και OCT.

Τους συναδέλφους κ.κ. Σπύρο Χαρίση, Τάσο Αναστασάκη και Βασίλη Παντελεοντίδη, για την βοήθεια και συμπαράσταση που ακούραστα παρείχαν σε σειρά πειραμάτων.

Τον κ. Χάρη Γκίνη, Φυσικό στο Ινστιτούτο Οπτικής και Όρασης, της Ιατρικής Σχολής, για την σημαντική βοήθεια στην ρύθμιση του διοδικού laser 670 που χρησιμοποιείται στην πλειοψηφία των πειραμάτων.

Τους κ.κ. Σταύρο Σμυρλή και Βασίλη Νικηφορίδη, Φυσικούς του Ινστιτούτου Οπτικής και Όρασης για την πολύτιμη βοήθεια τους στην διαχείριση των πειραμάτων.

Τον κ. Νίκο Ανδρεαδάκη, Επίκ. Καθηγητή του Παιδαγωγικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης ευχαριστώ θερμά, για την φιλολογική επιμέλεια του κειμένου.

Τη σύζυγό μου Αργυρώ Σπανουδάκη, Μαθηματικό, ευχαριστώ μαζί με τα παιδιά μου, για την αντοχή που έδειξαν και την ηθική στήριξη που πρόσφεραν, όλο το χρόνο που απαιτήθηκε και ανάλογα στερήθηκαν, για την εκπόνηση αυτού του έργου.

Τους γονείς μου Βενιζέλο και Στέλλα, για όλες τις θυσίες που έχουν κάνει, για να είμαι σε θέση να αναπτύσσω αυτό το θέμα σήμερα.

Ηράκλειο, Δεκέμβριος 2007

Εμμανουήλ Β. Χριστοδουλάκης

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η θρόμβωση της αμφιβληστροειδικής φλέβας είναι μια πολύ συχνή αγγειακή διαταραχή στην κλινική πράξη.<sup>1</sup> Η τρέχουσα θεραπευτική αντιμετώπιση περιορίζεται στην πρόληψη και αντιμετώπιση των επιπλοκών που πιθανόν να εμφανιστούν με την πάροδο του χρόνου. Πολυάριθμες θεραπείες έχουν περιγραφεί, φαρμακευτικές και χειρουργικές, αλλά στην πράξη δεν υπάρχουν σημαντικά αποτελέσματα για την πλήρη αποκατάσταση της νόσου.

Ερέθισμα για την παρούσα διατριβή αποτέλεσε η σημαντική πρόοδος στην τεχνική των μικροχειρουργικών επεμβάσεων του αμφιβληστροειδή και οι νεότερες θεωρήσεις σχετικά με την άμεση ενδοβολβική χορήγηση φαρμάκων που στοχεύουν σε θεραπευτικά επίπεδα στον αμφιβληστροειδή. Η βασική προς διερεύνηση υπόθεση αφορούσε τη δυνατότητα χορήγησης θρομβολυτικών φαρμάκων ενδοβολβικά με στόχο τη λύση του φλεβικού θρόμβου στην αμφιβληστροειδική κυκλοφορία.

Το γενικό μέρος μετά από μια περιγραφή της ανατομίας των αγγείων του αμφιβληστροειδή, ασχολείται με τη θρόμβωση της φλέβας, τις μέχρι σήμερα θεραπευτικές προσεγγίσεις, αλλά και νεότερες ιδέες όπως συστήματα παρατεταμένης αποδέσμευσης φαρμάκων (sustained release systems).

Ανασκοπούνται ακόμη βασικές αρχές του συστήματος θρόμβωσης και θρομβόλυσης, πληροφορίες για τα θρομβολυτικά φάρμακα (rtPA) που χρησιμοποιούνται στα πειράματά μας, καθώς και πληροφορίες σχετικά με τους

---

ιστικούς φραγμούς του αμφιβληστροειδή, που παίζουν σημαντικό ρόλο για τη βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου στα σημεία ενδιαφέροντος.

Στο ειδικό μέρος περιγράφονται οι κλινικές μελέτες που πραγματοποιήσαμε (case series) και σειρά πειραματικών προσεγγίσεων για τη διερεύνηση της υπόθεσης εργασίας σχετικά με τη δυνατότητα λύσης του φλεβικού θρόμβου του αμφιβληστροειδή με εξωαγγειακή χορήγηση θρομβολυτικού μετά από ενδοβολβική έγχυση.

# **A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

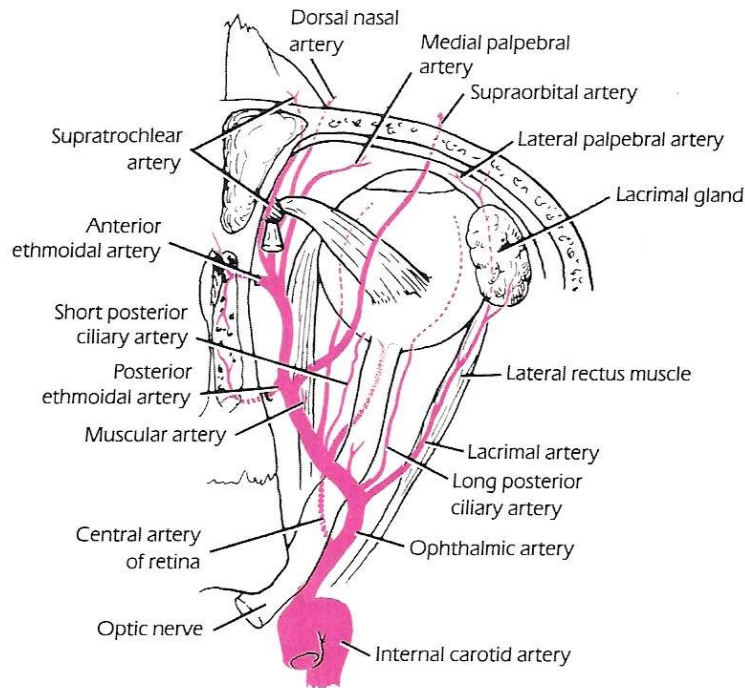
## **1. ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΘΕΩΡΗΣΗ**

Ο αμφιβληστροειδής αιματώνεται από δυο πηγές: α. η έξω στιβάδα, περιλαμβάνει τα ραβδία – κωνία και την έξω κοκκώδη στιβάδα του αμφιβληστροειδή, αιματώνεται από τα χοριοειδικά τριχοειδή· τα αγγεία αυτά δεν εισέρχονται στον αμφιβληστροειδή, αλλά το πλάσμα διαχέεται στο χώρο μεταξύ των κυττάρων. β. η έσω στιβάδα αγγειώνεται από την κεντρική αμφιβληστροειδική αρτηρία και φλέβα· πρόκειται για τελικές αρτηρίες, και δεν υπάρχουν αρτηριοφλεβικές αναστομώσεις. Η ακεραιότητα του αμφιβληστροειδή εξαρτάται και από τις δυο κυκλοφορίες, και καμία από αυτές δεν αρκεί από μόνη της.

Τα αγγεία του αμφιβληστροειδή συνήθως δεν επεκτείνονται βαθύτερα από τη μέση αφοριστική μεμβράνη (στα όρια έξω δικτυωτής – έσω κοκκώδους στιβάδας), και όπου διασταυρώνονται φλεβίδια και αρτηριόλια, υπάρχει κοινή βασική μεμβράνη. Αποφρακτικές διαταραχές των φλεβών συμβαίνουν συνήθως στις αρτηριοφλεβικές διασταυρώσεις.

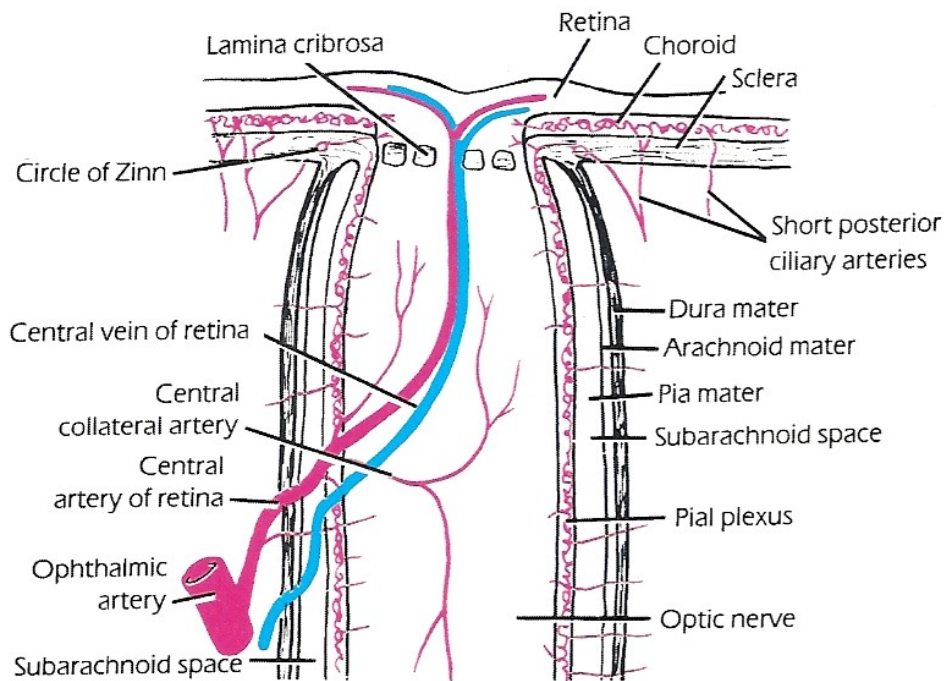
**Η οφθαλμική αρτηρία** είναι κλάδος της έσω καρωτίδας μετά την ανάδυσή της από τον έσω σηραγγώδη κόλπο, έσω από τις πρόσθιες κλινοειδείς αποφύσεις. Περνά στο οπτικό κανάλι κάτω και κροταφικά από το οπτικό νεύρο, στον χώρο μεταξύ σκληράς – αραχνοειδούς μήνιγγας. Η πορεία της οφθαλμικής αρτηρίας μπορεί να είναι πολύ ελικοειδής και δίνει πολλούς κλάδους : κεντρική αρτηρία αμφ/δή, δακρυϊκή αρτηρία, ακτινοειδείς αρτηρίες, υπερκόγχια αρτηρία, οπίσθιες – πρόσθιες ηθμοειδείς, μηνιγγική αρτηρία, έσω βλεφαρικές και υπερτροχίλιες αρτηρίες, και τέλος ραχιαία αρτηρία της ρινός.





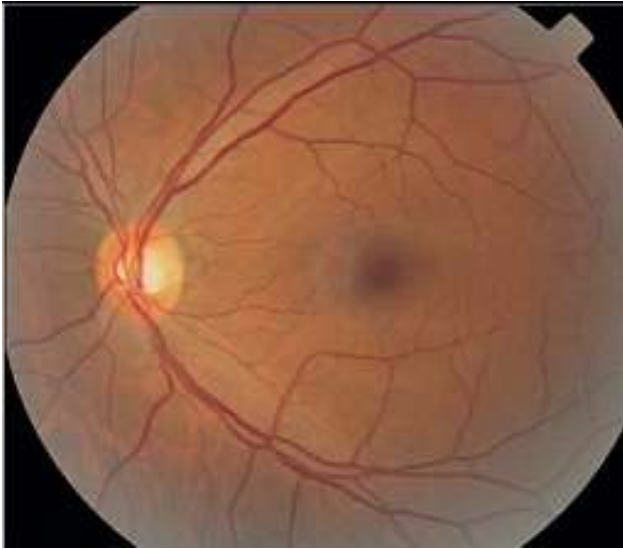
**Εικόνα 1.** Οφθαλμική αρτηρία και κόγχος (Snell RS και Lemp MA: Clinical Anatomy of the Eye. Blackwell Science, Second Edition 1998: Fig. 9 – 1)

**Η κεντρική αρτηρία του αμφιβληστροειδή** είναι ο πρώτος κλάδος της οφθαλμικής αρτηρίας. Έχει διάμετρο 0,3mm και έχει πρόσθια κατεύθυνση, προσκολλημένη στη σκληρά μήνιγγα του οπτικού νεύρου. Εισέρχεται στο κάτω – έσω τμήμα του οπτικού νεύρου περίπου 12 mm όπισθεν του βολβού, διαπερνώντας πρώτα την σκληρά και αραχνοειδή μήνιγγα, διατηρώντας ένα περίβλημα. Σε κοντινή απόσταση διαπερνά και την χοριοειδή μήνιγγα και εισέρχεται στο οπτικό νεύρο. Φθάνοντας στο κέντρο του οπτικού νεύρου, η αρτηρία συνοδευόμενη από τη κεντρική φλέβα και ένα συμπαθητικό πλέγμα, διαπερνά το ηθμοειδές πέταλο και εισέρχεται στον οφθαλμό (διάμετρος αμφ/κής αρτηρίας: 170μm). Στην περιοχή αυτή οι οπίσθιες ακτινοειδείς αρτηρίες σχηματίζουν ένα αναστομωτικό κύκλο στον σκληρό γύρω από το οπτικό νεύρο· μικροί κλάδοι του διαπερνούν το χοριοειδή για να αιματώσουν τον οπτικό δίσκο και τον παρακείμενο αμφιβληστροειδή.



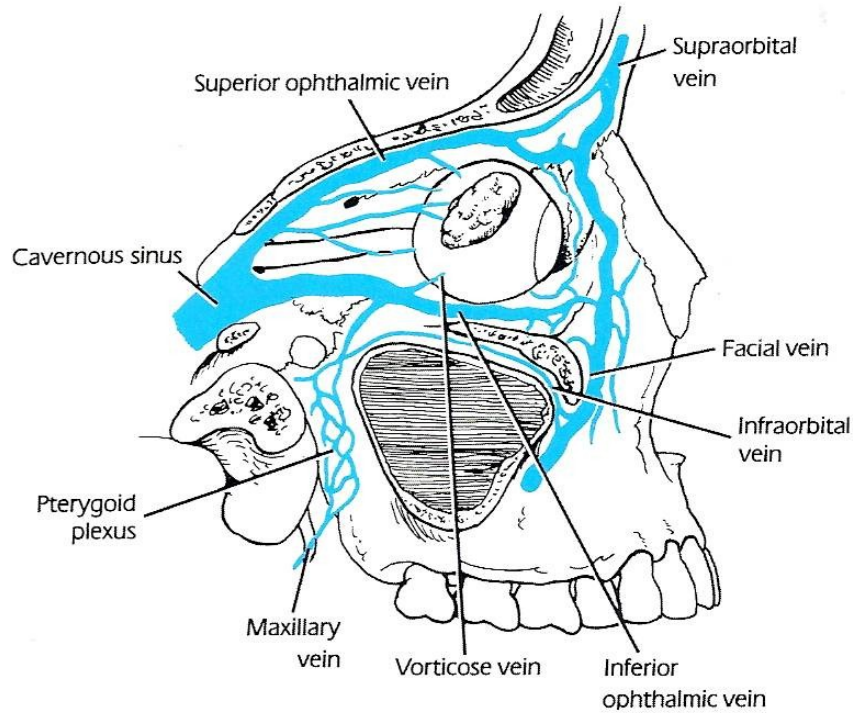
Εικόνα 2. Αρτηριακή και φλεβική κυκλοφορία οπτικού δίσκου – οπτικού νεύρου (Snell RS και Lemp MA: Clinical Anatomy of the Eye. Blackwell Science, Second Edition 1998: Fig. 6 – 40)

Η κεντρική αρτηρία στη συνέχεια διαχωρίζεται σε 2 κλάδους (άνω και κάτω) (διάμετρος 110  $\mu\text{m}$ ) και μετά από λίγα χιλιοστά διχτομούνται σε άνω και κάτω ρινικούς και κροταφικούς κλάδους· αυτό μπορεί να συμβαίνει είτε μέσα στο οπτικό νεύρο είτε στην επιφάνεια του οπτικού δίσκου. Τα αμφιβληστροειδικά αγγεία στερούνται έσω ελαστικού πετάλου και ενός συνεχούς στρώματος λείων μυϊκών κυττάρων, όπως όλα τα αγγεία στο σώμα και γι' αυτό ονομάζονται και αρτηριόλια. Κάθε κλάδος αιματώνει περίπου ένα τεταρτημόριο του αμφιβληστροειδή και δεν αλληλοκαλύπτονται ή αναστομώνονται. Οι ρινικοί κλάδοι έχουν σχετικά ευθεία πορεία προς την προιονωτή περιφέρεια, ενώ οι κροταφικοί κλάδοι διάγουν σχετικά τοξοειδή διαδρομή γύρω από την κεντρική περιοχή (ωχρά) και κατευθύνονται στην περιφέρεια. Οι αρτηρίες και τα αρτηριόλια βρίσκονται σχετικά επιφανειακά στον αμφιβληστροειδή και μόνο τα τριχοειδή βρίσκονται βαθύτερα μέχρι το επίπεδο της έσω κοκκώδους στιβάδας. Τα αρτηριόλια ακολουθεί ένα διάχυτο τριχοειδικό δίκτυο, που το τοίχωμά του καλύπτεται από μη θυριδωτό ενδοθήλιο. Τα αμφιβληστροειδικά τριχοειδή σχηματίζουν επιφανειακό και εν τω βάθει δίκτυο, που δεν εκτείνεται βαθύτερα από την έσω κοκκώδη στιβάδα.



Εικόνα 3. Φυσιολογικός αμφιβληστροειδής, με την ωχρά και τα μείζονα αγγειακά τόξα

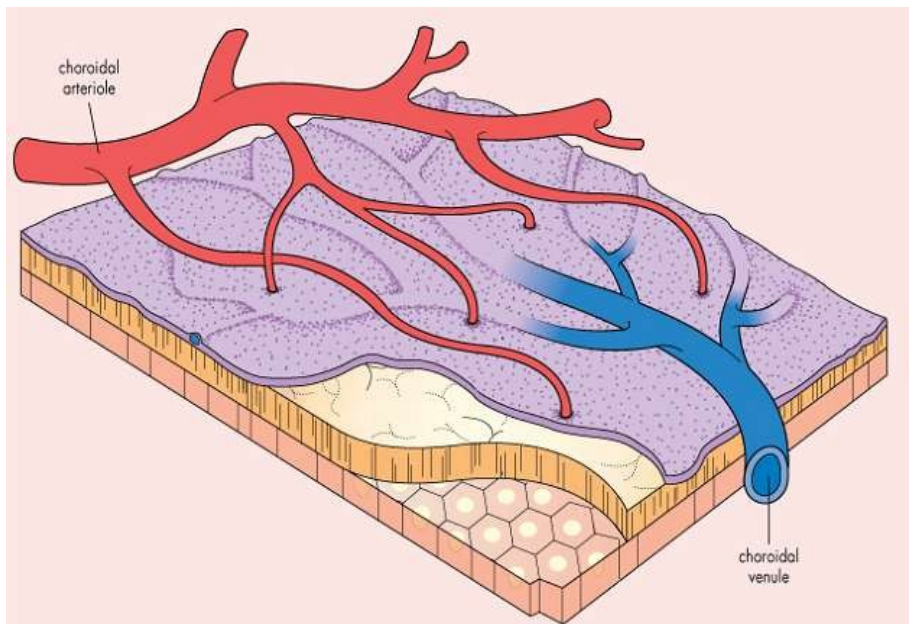
**Η κεντρική φλέβα του αμφιβληστροειδούς** σχηματίζεται από τους κλάδους που συνοδεύουν τις αρτηρίες. Η διάμετρος των φλεβών είναι περίπου  $1/3$  με  $1/4$  μεγαλύτερη από την αντίστοιχη αρτηρία. Το δίκτυο των φλεβών, αν και παρόμοιο δεν είναι ακριβώς ίδιο με αυτό των φλεβών. Οι αρτηρίες έχουν την τάση να βρίσκονται πιο επιφανειακά (προς την υαλοειδική κοιλότητα) σε σχέση με τις φλέβες, και σε αρτηριοφλεβικές διασταυρώσεις βρίσκονται άνωθεν των φλεβών. Τα φλεβίδια δημιουργούνται από το τριχοειδικό δίκτυο και ενώνονται να σχηματίζουν τις μεγαλύτερες επιφανειακές φλέβες που πλησίον του δίσκου έχει διάμετρο  $150 \mu\text{m}$ . Η κεντρική φλέβα εξέρχεται του βολβού από το ηθμοειδές πέταλο (lamina cribrosa) (Εικόνα 2), και κατευθύνεται προς τα πίσω με πορεία μέσα στο οπτικό νεύρο. Περίπου  $10 \text{ mm}$  όπισθεν του βολβού η κεντρική φλέβα αφήνει το νεύρο και αναδύεται από το σκληρο – αραχνοειδές έλυτρο, όπισθεν της αρτηρίας. Η φλέβα στη συνέχεια παροχετεύει απευθείας στον σηραγγώδη κόλπο ή εισέρχεται στην άνω οφθαλμική φλέβα· η κεντρική φλέβα επικοινωνεί πάντοτε με την άνω οφθαλμική φλέβα (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Φλεβική παροχέτευση δεξιού κόγχου (Snell RS και Lemp MA: Clinical Anatomy of the Eye. Blackwell Science, Second Edition 1998: Fig. 9 – 6)

**Ο χοριοειδής** είναι ένας λεπτός, καφεοειδής χιτώνας που καλύπτει το εσωτερικό του σκληρού· είναι ο πιο αγγειοβριθής ιστός του οφθαλμού και από τους πιο αγγειοβριθείς του σώματος. Αποτελείται από τρεις στιβάδες: **α) την αγγειώδη στιβάδα** στο εξωτερικό, από χαλαρό συνδετικό ιστό, μελανοκύτταρα, και πολυάριθμα μεγάλα και μεσαίου μεγέθους αγγεία. Οι φλέβες είναι μεγαλύτερες και συγκλίνουν να σχηματίσουν τις 4 – 5 περιδίνητες φλέβες, που διαπερνούν τον σκληρό για να ενωθούν με την οφθαλμική φλέβα, **β) την τριχοειδική στιβάδα** που αποτελείται από ένα ευρύ δίκτυο τριχοειδών τα οποία έχουν στο άκρο τους σακοειδείς διευρύνσεις· αρδεύονται από αρτηρίες από την αγγειώδη στιβάδα, και παροχετεύουν στις φλέβες της. Τα τριχοειδή υποστηρίζονται από συνδετικό ιστό και μελανοκύτταρα. Έχουν ένα συνεχές δίκτυο από θυριδωτά ενδοθηλιακά κύτταρα, **γ) τη μεμβράνη του Bruch** στο εσωτερικό, που αποτελείται από 5 διαφορετικά στοιχεία: i. τη βασική μεμβράνη του ενδοθηλίου των χοριοειδικών τριχοειδών, ii. την έξω στιβάδα κολλαγόνων ινών, iii. το δίκτυο ελαστικών ινών, iv. την έσω στιβάδα κολλαγόνων ινών, και v. τη βασική μεμβράνη του μελάγχρου επιθηλίου του αμφιβληστροειδή.

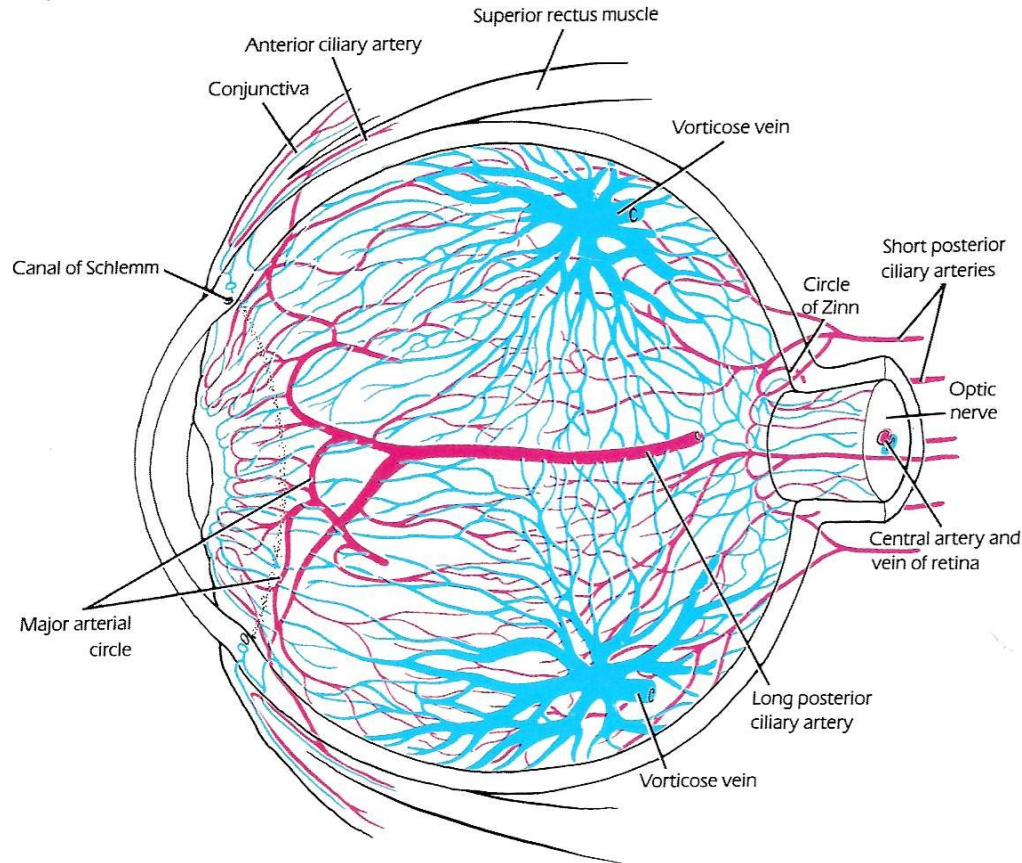
Η χοριοειδική κυκλοφορία είναι υπεύθυνη για τη διατροφή του συμπλέγματος φωτοϋποδοχέων – μελάγχρου επιθηλίου. Η αιμάτωση του χοριοειδή γίνεται από κλάδους των προσθίων και οπισθίων ακτινοειδών αρτηριών. Η δομή της χοριοειδικής κυκλοφορίας είναι περιοχική – τμηματική, από το επίπεδο των οπίσθιων ακτινοειδών μέχρι τις περιδίνητες φλέβες. Αντίθετα με την κατανομή των αμφιβληστροειδικών αγγείων οι χοριοειδικές αρτηρίες και φλέβες δεν πορεύονται παράλληλα μεταξύ τους. Κάθε τελικό χοριοειδικό αρτηριόλιο αρδεύει ένα ανεξάρτητο πολυγωνικό δίκτυο χοριοτριχοειδών που λέγεται λοβίδιο, που με τη σειρά του παροχετεύεται από ένα φλεβίδιο. Αντίθετα από τα αμφιβληστροειδικά τριχοειδή, τα χοριοτριχοειδή έχουν ανοίγματα 700-800μm, που επιτρέπουν την ταχύτερη διακίνηση μορίων – τροφής.



Εικόνα 5. Χοριοειδική κυκλοφορία σε λοβίδια. (Duker J, Weiter JJ. Ocular circulation. In: Tasman W, Jaeger EA, eds. Duane's foundations of clinical ophthalmology. New York: JB Lippincott; 1991:1-34)

Υπάρχουν **τρεις ομάδες ακτινοειδών αρτηριών**: οι μακρές οπίσθιες, οι βραχείες οπίσθιες και οι πρόσθιες. **Οι μακρές οπίσθιες** είναι 2 συνήθως και προέρχονται από την οφθαλμική αρτηρία. Κατευθύνονται πρόσθια ανάμεσα στο σκληρό και τον οριοειδή προς το ακτινωτό σώμα και σχηματίζουν τον μείζων αρτηριακό κύκλο της ίριδας. **Οι βραχείες οπίσθιες** ακτινοειδείς αρτηρίες είναι συνήθως 7 στον αριθμό και αναδύονται από την οφθαλμική αρτηρία όταν εισέρχεται στο οπτικό νεύρο. Διακλαδίζεται σε 10 – 20 κλάδους που κατευθύνονται πρόσθια προς το οπτικό νεύρο και αιματώνουν τον χοριοειδή μέχρι τον ισημερινό, όπου

αναστομώνονται με κλάδους των μακρών οπίσθιων ακτινοειδών και του κύκλου της ίριδος. **Οι πρόσθιες** ακτινοειδείς αρτηρίες προέρχονται από τους μυϊκούς κλάδους της οφθαλμικής αρτηρίας στους 4 ορθούς μύες. Οι αρτηρίες αυτές αιματώνουν το σκληρό και τον επιπεφυκότα και δίνουν αιμάτωση στις καταφύσεις των ορθών.



Εικόνα 6. Διαγραμματική απεικόνιση της αρτηριακής – φλεβικής κυκλοφορίας του χοριοειδή (Snell RS και Lemp MA: Clinical Anatomy of the Eye. Blackwell Science, Second Edition 1998: Fig. 9 – 3)

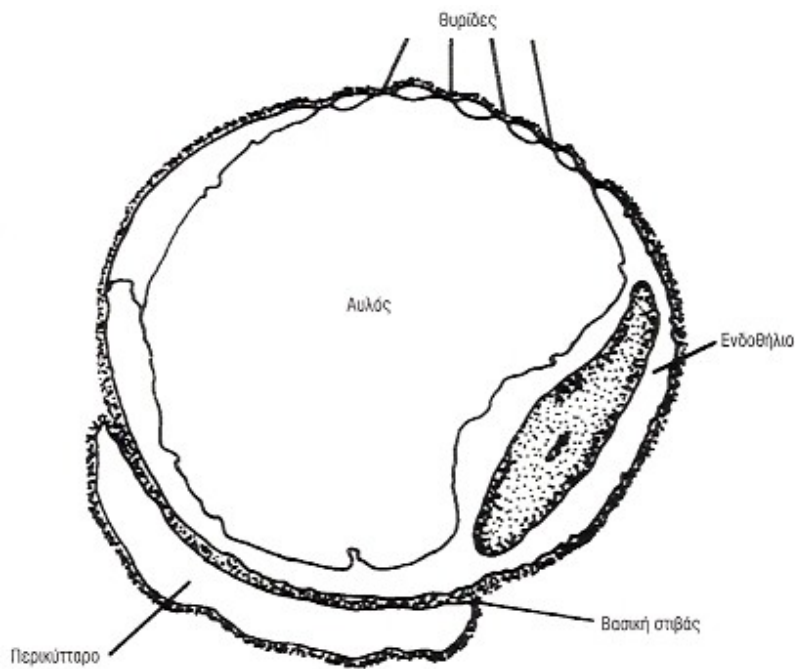
### **Αιματοαμφιβληστροειδικός Φραγμός**

Ο ευαίσθητος νευροαισθητήριος αμφιβληστροειδής προστατεύεται από την επίδραση βλαπτικών παραγόντων μέσω 2 φραγμών που η λειτουργία τους εξαρτάται από στερεές συνδέσεις, που περιορίζουν την διακυτταρική μετακίνηση των υδατοδιαλυτών μορίων και ιόντων, όπως και τη διάχυση τοξικών μακρομορίων, αποτρέποντας την είσοδο τους στον αμφιβληστροειδή. Για το έξω 1/3 του νευροαισθητήριου αμφιβληστροειδή υπάρχει ο **έξω αιματο-αμφιβληστροειδικός φραγμός** στο επίπεδο του μελάγχρου επιθηλίου του αμφιβληστροειδή, μέσω του

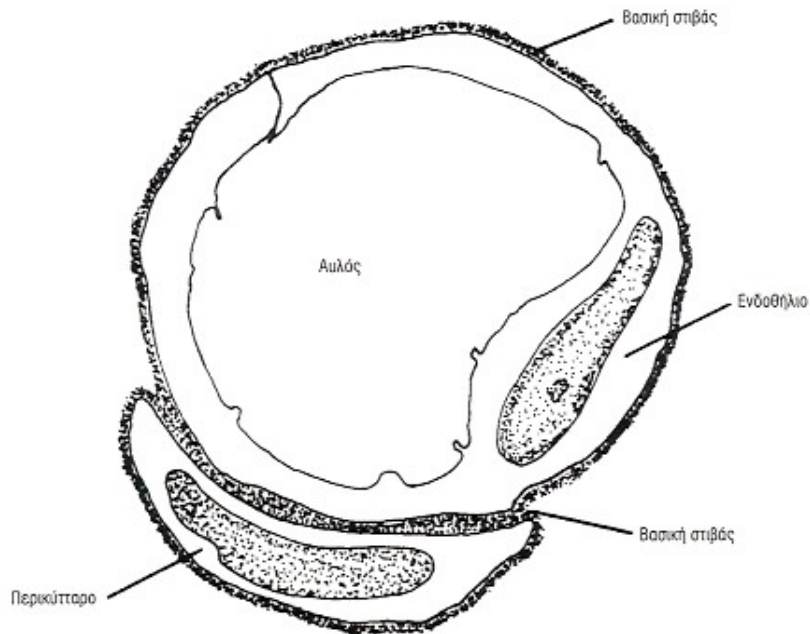
συμπλέγματος συνδέσεων (ζωνοειδείς αποφράξεις, ζωνοειδείς προσκολλήσεις) και ο **έσω αιματο-αμφιβληστροειδικός φραγμός** στο επίπεδο των αμφιβληστροειδικών αγγείων, που αποτελείται από τη μονή στιβάδα μη θυριδωτών ενδοθηλιακών κυττάρων, με σταθερές συνδέσεις μεταξύ τους, που είναι αδιαπέραστη σε ανιχνευτικές ουσίες όπως η φλουορεσκεΐνη.<sup>2</sup>

Τα χοριοτριχοειδή με πολυάριθμα ανοίγματα-θυρίδες και απουσία στενών συνδέσεων, δεν φαίνεται να έχουν ρόλο στη λειτουργία του φραγμού. Η μεμβράνη του Bruch, μεταξύ των χοριοτριχοειδών και του μελάγχρου επιθηλίου, δρα ως φραγμός διάχυσης μόνο για τα μεγάλα μόρια.

Ο αιματοαμφιβληστροειδικός φραγμός φαίνεται να λειτουργεί αμφίδρομα, δηλαδή να μην επιτρέπει την είσοδο μορίων από τη συστηματική κυκλοφορία στον ευαίσθητο νευροαισθητήριο αμφιβληστροειδή, αλλά και περιορίζοντας ουσίες από το υαλώδες να περάσουν στη συστηματική κυκλοφορία.<sup>3</sup>



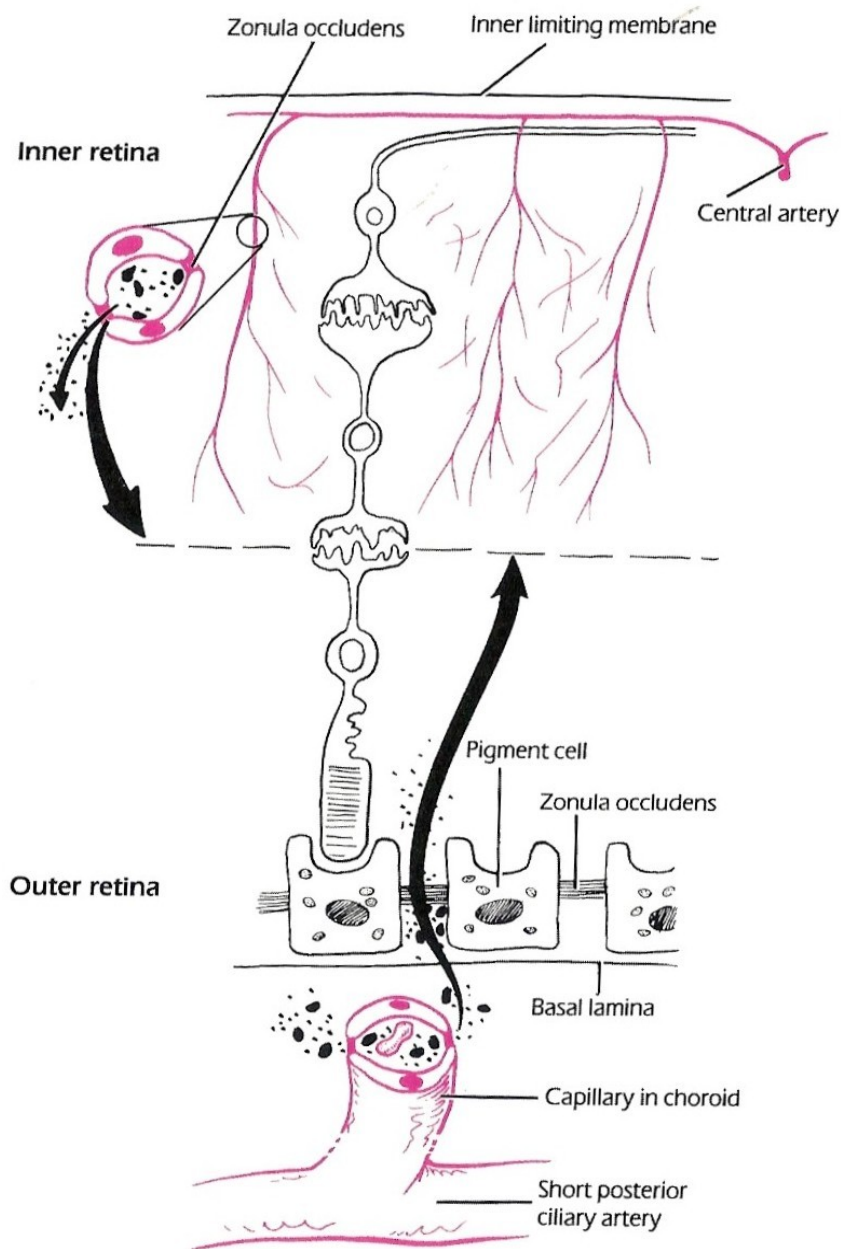
Εικόνα 7. Θυριδωτά τριχοειδή του χοριοειδούς (Ανατομία του Οφθαλμού, σε: Βασικές Επιστήμες και Οφθαλμολογία, Τόμος 2, *Basic and Clinical Science Course*, American Academy of Ophthalmology, Εκδόσεις Πασχαλίδη, 1997: 68)



Εικόνα 8. Μη θυριδωτά τριχοειδή του αμφιβληστροειδή. Σύγκριση με εικόνα 6 (Ανατομία του Οφθαλμού, σε: Βασικές Επιστήμες και Οφθαλμολογία, Τόμος 2, *Basic and Clinical Science Course*, American Academy of Ophthalmology, Εκδόσεις Πασχαλίδη, 1997: 68)

Μια βασική στιβάδα καλύπτει την εξωτερική επιφάνεια του ενδοθηλίου και μέσα στη βασική μεμβράνη υπάρχει ένα διακεκομμένο στρώμα περικυττάρων, που περιβάλλονται από το υλικό της δικής τους βασικής μεμβράνης. (Εικόνα 7)

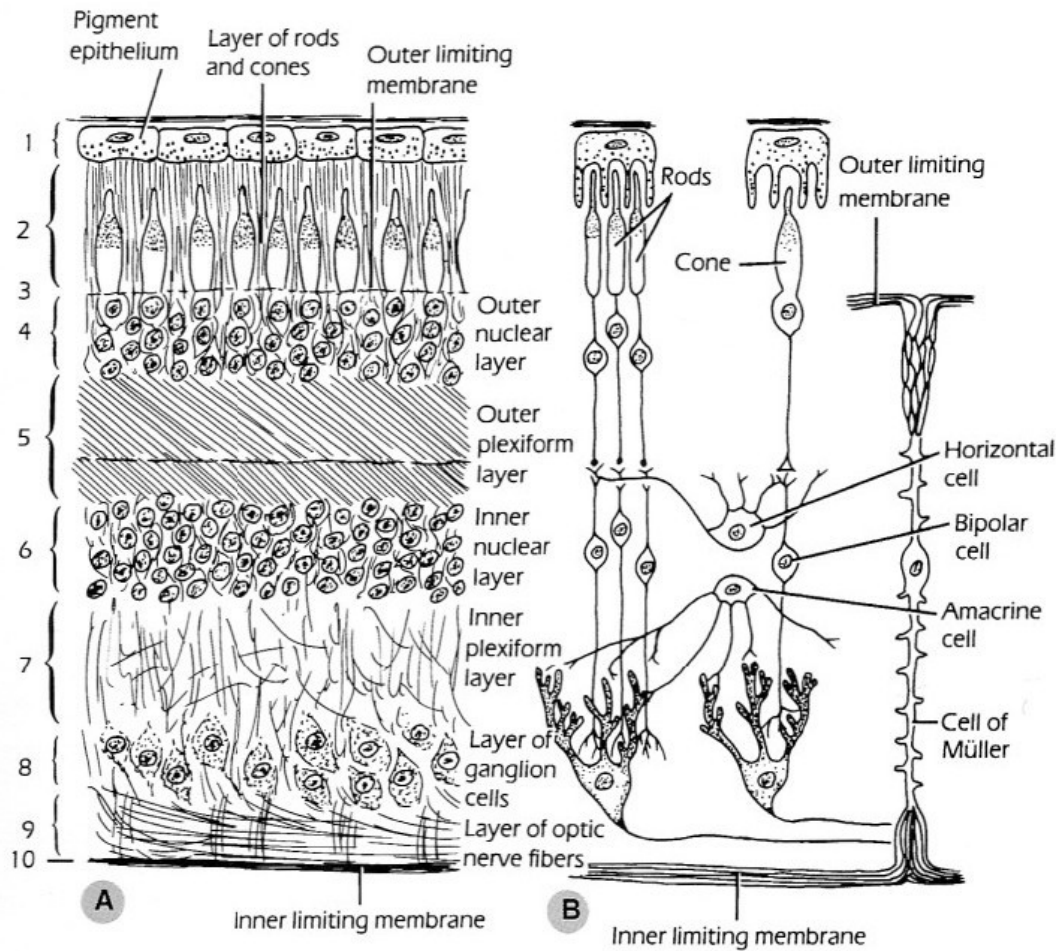




**Εικόνα 9.** Διάγραμμα που δείχνει την αιμάτωση του νευροαισθητήριου αμφιβληστροειδή. Τα έσω 2/3 αιματώνονται από τριχοειδή της κεντρικής αρτηρίας και το έξω 1/3 μέσω διάχυσης ουσιών από χοριοειδικά τριχοειδή. Ο αμφιβληστροειδής όπως ο εγκέφαλος, προστατεύεται από τον αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό, που σχηματίζεται από τις ζωνοειδείς αποφράξεις (zonulae occludents) των ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών της κεντρικής αρτηρίας και αυτών μεταξύ των μεμβρανών των κυττάρων μελαχρόου επιθηλίου (Snell RS και Lemp MA: Clinical Anatomy of the Eye. Blackwell Science, Second Edition 1998: Fig. 9 – 5)

Αξίζει να αναφερθεί ο ρόλος της **έσω αφοριστικής μεμβράνης** (ILM-internal limited membrane), που δεν είναι πραγματική μεμβράνη. Σχηματίζεται από τις προεκβολές (πόδια) των κυττάρων του Moller και προσκολλήσεις στο βασικό πέταλο. Το βασικό πέταλο είναι ομαλό από την πλευρά του υαλοειδούς, αλλά εμφανίζεται κυματοειδές από την πλευρά του αμφιβληστροειδή όπου ακολουθεί τα περιφερικά άκρα των κυττάρων του Moller.<sup>4</sup> Υπάρχει πληροφορία για το ρόλο της ως φραγμό διάχυσης: συγκεκριμένα η περιεκτικότητα της έσω και έξω αφοριστικής μεμβράνης σε γλυκοζαμινογλυκάνες προσδίδει χαρακτηριστικό να επηρεάζεται η διαπερατότητα των μορίων από το μοριακό βάρος και ακόμα περισσότερο από το φορτίο επιφανείας τους: ειδικότερα η κατιονική φόρτιση επιφάνειας των μορίων είναι περιοριστικός παράγοντας διάχυσης, πιθανά λόγω της δέσμευσης σε μακρομόρια, ενώ σε ουδέτερα φορτισμένα η ουδέτερα μόρια δεν συμβαίνει αυτό.<sup>5,6</sup>

Οι φραγμοί αυτοί διαταράσσονται σαφώς σε κατάσταση φλεγμονής αλλά και σε επίδραση παραγόντων όπως ο **αυξητικός ενδοθηλιακός παράγοντας (VEGF)**. Προηγούμενη εργασία των Barber και Antonetti<sup>7</sup> έδειξε ότι η ενδοϋαλοειδική ένεση 0,1 ng VEGF 164 σε αρουραίους, αυξάνει σαφώς την διαπερατότητα των αμφιβληστροειδικών αγγείων· επίσης σε διαβητικούς με σαφή διαταραχή του φραγμού διαπιστώνεται σαφής αύξηση του VEGF, αλλά και σε πειραματικά μοντέλα κονίκλων έχει δεικτεί ότι η ενδοϋαλοειδική ένεση VEGF προκαλεί νεοαγγείωση και καταστολή του αιματοαμφιβληστροειδικού φραγμού.<sup>8,9</sup> Επιπλέον έχει δεικτεί ότι σε ενδοφθαλμίτιδα η βανκομυκίνη απομακρύνεται πολύ νωρίτερα από το υαλώδες σε σχέση με το φυσιολογικό υαλώδες.<sup>10</sup>



Εικόνα 10. Α. οι στιβάδες του αμφιβληστροειδή σε μια τυπική ιστολογική εικόνα (διαγραμματικά). Β. διάγραμμα που δείχνει την κατανομή των νευρικών κυττάρων. Οι προσεκβολές των στηρικτικών κυττάρων του Moller σχηματίζουν την έσω (inner limited membrane) και την έξω αφοριστική μεμβράνη (outer limited membrane) (Snell RS και Lemp MA: Clinical Anatomy of the Eye. Blackwell Science, Second Edition 1998: Fig. 6 – 32)

## **2. ΤΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ: Η ΘΡΟΜΒΩΣΗ ΤΗΣ ΦΛΕΒΑΣ ΤΟΥ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ**

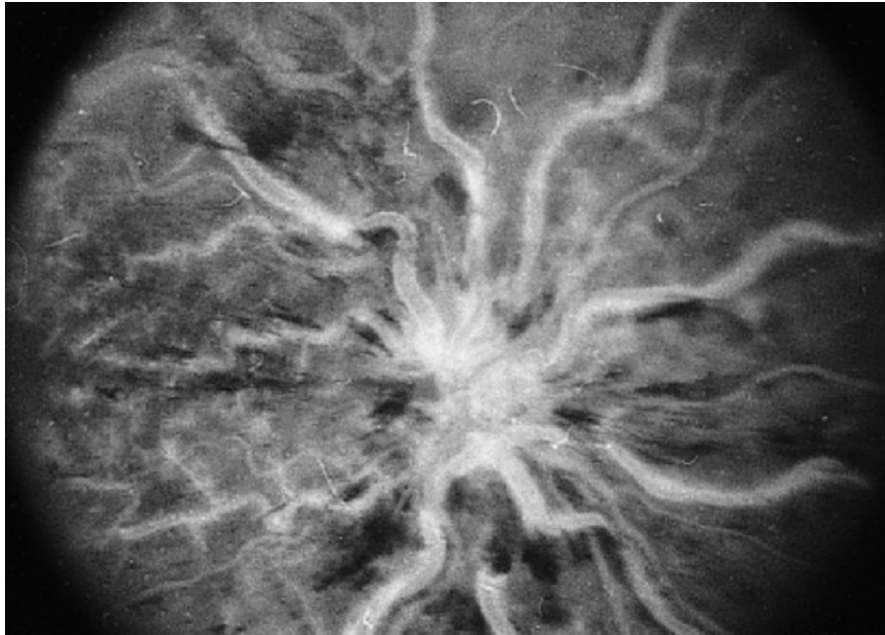
Η φλεβική θρόμβωση αποτελεί μια από τις σημαντικότερες και συχνότερες αγγειακές παθήσεις του οφθαλμού που προσβάλλει την κεντρική αμφιβληστροειδική φλέβα ή τους κλάδους της, ενώ είναι η δεύτερη κατά σειρά συχνότητας αγγειακή διαταραχή του αμφιβληστροειδούς μετά τη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και φθάνει μέχρι το 1,6% σε ενήλικες άνω των 49 ετών.<sup>11,12</sup>

Η εντόπιση και η έκταση της θρόμβωσης καθορίζει αν η απόφραξη θα παραμείνει ασυμπτωματική ή θα προκαλέσει σοβαρή απώλεια όρασης.<sup>13</sup>

Διακρίνεται σε θρόμβωση κεντρικής φλέβας (Central Vein Occlusion ή CVO) και σε θρόμβωση κλάδου φλέβας (Branch Vein Occlusion ή BVO) με κύριες εκδηλώσεις τις αμφιβληστροειδικές αιμορραγίες σε 4 τεταρτημόρια και διασταλμένα ελικοειδή αγγεία για την CVO, και τις αμφ/κές αιμορραγίες στην κατανομή της θρομβωμένης φλέβας για την BVO αντίστοιχα.<sup>14</sup> Ανάλογες διαφορές υπάρχουν στην παθοφυσιολογία, τις υποκείμενες συστηματικές συσχετίσεις, την κλινική πορεία και θεραπεία. Η κεντρική θρόμβωση περαιτέρω διαχωρίζεται σε ισχαιμική και μη ισχαιμική μορφή (εικόνα) με τη γνώση πως τα 2/3 των ασθενών με ισχαιμική μορφή θα αναπτύξουν νεοαγγείωση ίριδος και νεοαγγειακό γλαύκωμα.<sup>15</sup>



Εικόνα 10. Μη ισχαιμική θρόμβωση κεντρικής φλέβας. Φωτογραφία βυθού με διάχυτες αιμορραγίες, οίδημα οπτικής θηλής, διασταλμένες ελικοειδείς φλέβες και ένα βαμβακόμορφο εξίδρωμα



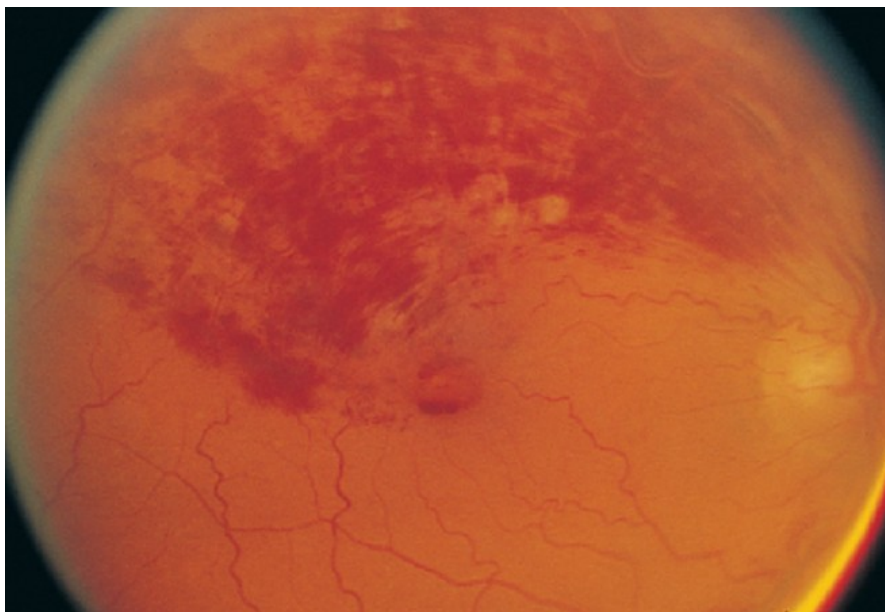
Εικόνα 11. Μη ισχαιμική θρόμβωση κεντρικής φλέβας. Η φλουοροαγγειογραφία αναδεικνύει έντονη διαστολή – ελίκωση φλεβών, οίδημα οπτικής θηλής, και κατακράτηση χρωστικής στο αγγειακό τοίχωμα με υποφθορισμό. Δεν υπάρχουν περιοχές μη διήθησης



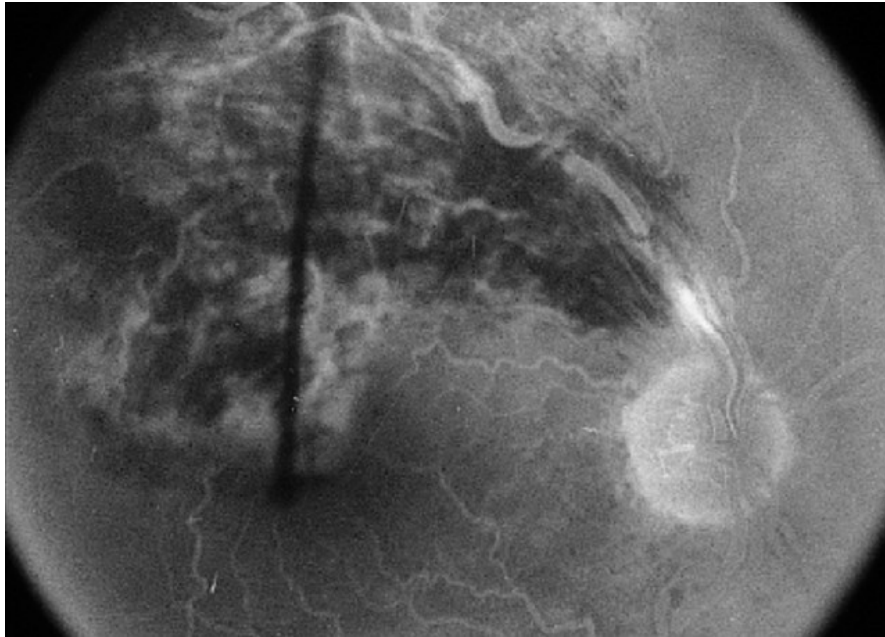
Εικόνα 13. Ισχαιμική θρόμβωση κεντρικής φλέβας. Φωτογραφία βυθού με εκτεταμένες διάχυτες αμφιβληστροειδικές αιμορραγίες, διασταλμένες ελικοειδείς φλέβες και διάσπαρτα βαμβακόμορφα εξιδρώματα



Εικόνα 14. Ισχαιμική θρόμβωση κεντρικής φλέβας. Η φλουοροαγγειογραφία αναδεικνύει έντονο υποφθορισμό, δευτεροπαθώς στην εκτεταμένη τριχοειδική μη διήθηση. Εκτεταμένη διαστολή φλεβικού δικτύου. Κατακράτηση χρωστικής στο αγγειακό τοίχωμα στις ισχαιμικές περιοχές



Εικόνα 15. Θρόμβωση κλάδου φλέβας αμφιβληστροειδούς. Φωτογραφία βυθού με εκτεταμένες αμφιβληστροειδικές αιμορραγίες με κατανομή στην περιοχή της άνω κροταφικής φλέβας. Διακρίνονται διασταλμένες ελικοειδείς φλέβες, βαμβακόμορφα εξιδρώματα και οίδημα ωχράς



Εικόνα 16. Θρόμβωση κλάδου φλέβας αμφιβληστροειδούς. Η φλουροαγγειογραφία (ίδιος ασθενής με εικόνα 14) αναδεικνύει έντονο υποφθορισμό, δευτεροπαθώς στην εκτεταμένη αιμορραγία (απόκρυψη) στην κατανομή της άνω κροταφικής. Διακρίνεται διαστολή – ελίκωση φλεβών, και κατακράτηση χρωστικής με ίδια κατανομή

## **2.1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ – ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ – ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ**

### **2.1.1. Θρόμβωση κεντρικής φλέβας**

Απαντάται συχνότερα σε ηλικία άνω των 50 ετών. Σημαντικότερες συσχετίσεις με συστηματικές παθήσεις υπάρχουν με την αρτηριακή υπέρταση (65 – 75%), το σακχαρώδη διαβήτη (2 – 13%), την αρτηριοσκληρωτική καρδιαγγειακή νόσο, καταστάσεις αυξημένης γλοιότητας αίματος (διαταραχές πήξης, αυξημένος αιματοκρίτης, δυσκρασίες αίματος κλπ) και αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης. Το χρόνιο γλαύκωμα ανοικτής γωνίας είναι συχνό εύρημα ασθενών με θρόμβωση κεντρικής φλέβας, ενώ οι ασθενείς με γλαύκωμα έχουν πενταπλάσια πιθανότητα για ανάπτυξη CVO.

Η ακριβής παθογένεση της απόφραξης κεντρικής φλέβας αμφιβληστροειδούς παραμένει αβέβαιη. Η παρουσία θρόμβου στο επίπεδο του ηθμοειδούς πετάλου (lamina cribrosa) και οπισθίστερα, στο επίπεδο του οπτικού νεύρου, έχει δειχθεί σε προηγούμενες ιστοπαθολογικές μελέτες. Η μηχανική πίεση από την παρακείμενη κεντρική αρτηρία που προκαλεί στροβιλώδη φλεβική ροή και στη συνέχεια ενδοθηλιακή βλάβη συχνά εμπλέκονται, ενώ υπό συζήτηση είναι η συμβολή άλλων αιτιοπαθογενετικών παραγόντων όπως η αυξημένη πηκτικότητα αίματος και οι διαταραχές ποικίλων αιμοστατικών μηχανισμών. Εναλλακτικές θεωρίες έχουν εκφραστεί : η CVO είναι ένα εύρημα τελικού σταδίου που προκαλείται από σειρά πρωτοπαθών βλαβών όπως δομικές ανωμαλίες του ηθμοειδούς πετάλου, συμπίεση ή φλεγμονή του οπτικού νεύρου, κογχικές βλάβες ή αιμοδυναμικές διαταραχές.

Η αμφιβληστροειδική κυκλοφορία είναι ένα σχετικά υψηλής αντίστασης – χαμηλής ροής σύστημα που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο σε αιματολογικούς παράγοντες. Η αυξημένη ταχύτητα καθίζησης ερυθρών, ο αυξημένος αιματοκρίτης, η ομοκυστεΐνη, τα αυξημένα επίπεδα ινωδογόνου, η αυξημένη γλοιότητα αίματος, η παρουσία αντιπηκτικής λύκου ή αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων, η ανεπάρκεια ενεργού C, μπορεί να σχετίζονται με αμφιβληστροειδική φλεβική νόσο. Από την άλλη, παραμένει άγνωστο αν είναι ικανοί αυτοί οι αιματολογικοί παράγοντες να



προκαλέσουν θρόμβωση, όπως και ο ακριβής ρόλος τους ως συμπαράγοντες θρόμβωσης.<sup>16,17,18</sup>

Σε διακοπή της φλεβικής κυκλοφορίας, αλλά συνέχιση της αρτηριακής προσφοράς, το αίμα λιμνάζει στα αμφιβληστροειδικά αγγεία, τα τριχοειδή διατείνονται, αυξάνει η διαπερατότητά τους και άφθονα αιμοσφαίρια εμποτίζουν το παρέγχυμα της θρομβωμένης περιοχής: αυτό εξηγεί τις ενδοαμφιβληστροειδικές αιμορραγίες στη φλεβική απόφραξη του αμφιβληστροειδή.

Οι ασθενείς με θρόμβωση κεντρικής φλέβας μπορεί να χάσουν όραση από ωχροπάθεια (ισχαιμία ή διαρροή), αιμορραγία (ενδοαμφιβληστροειδική ή ενδοϋαλοειδική από ισχαιμία) και άλλες επιπλοκές της ισχαιμικής μορφής της νόσου όπως νεοαγγειακό γλαύκωμα ή αποκόλληση του αμφιβληστροειδή.<sup>19</sup>

Πρέπει να κάνουμε διάκριση στις μορφές της κεντρικής θρόμβωσης γιατί η κλινική τους πορεία είναι διαφορετική.<sup>20</sup> Η **μη ισχαιμική μορφή της νόσου** αναγνωρίζεται από την παρουσία χρωστικής στα τριχοειδή κατά τη φλουροαγγειογραφία, συνήθως υπάρχει όραση  $> 20/400$  και δεν υπάρχουν πολλές ενδοαμφιβληστροειδικές αιμορραγίες. Οι ασθενείς χάνουν όραση συνήθως από οίδημα στην ωχρά. Αν η αρχική όραση είναι  $\geq 20/50$  έχει μεγάλη πιθανότητα να παραμείνει καλή, αν είναι μεταξύ  $20/50$  και  $20/200$  η πρόγνωση ποικίλλει, ενώ αν είναι χαμηλή  $< 20/200$  τότε είναι σχεδόν απίθανο να βελτιωθεί. Στην **ισχαιμική μορφή της νόσου** η οπτική οξύτητα εμφανίζει σοβαρή μείωση από ισχαιμία στην περιοχή της ωχράς (συνήθως  $< 20/400$ ). Περίπου 50% των ασθενών αυτών θα αναπτύξουν νεοαγγείωση ίριδος τους πρώτους 2-3 μήνες από την εμφάνιση της νόσου (γλαύκωμα των 100 ημερών). Επίσης πρέπει να ξέρουμε ότι το 25% των ασθενών με μη-ισχαιμική μορφή θα μεταπέσουν σε ισχαιμική μορφή θρόμβωσης κεντρικής φλέβας στους πρώτους μήνες.

### 2.1.2. Θρόμβωση κλάδου φλέβας

Οι κλαδικές θρομβώσεις του αμφιβληστροειδή συμβαίνουν περίπου 3 φορές συχνότερα από τις θρομβώσεις κεντρικής φλέβας. Άνδρες και γυναίκες προσβάλλονται σε ίδια συχνότητα με συνήθη ηλικία προσβολής μεταξύ 60 – 70 ετών. Πληθυσμιακές μελέτες αναφέρουν επιπολασμό μεταξύ 0.6% και 1.6% και επίπτωση 2,14/1000 άτομα για ηλικίες άνω των 40 ετών.<sup>21,22,23</sup>

Οι περισσότερες επιδημιολογικές και ιστοπαθολογικές μελέτες ενέχουν την αρτηριδιακή παθολογία ως υποκείμενη παθοφυσιολογία. Η κλαδική θρόμβωση συμβαίνει σχεδόν πάντα σε σημείο αρτηριοφλεβικής διασταύρωσης, όπου η αρτηρία και η φλέβα έχουν – μοιράζονται κοινό έλυτρο. Η γειτονική – διπλανή αρτηρία, είναι σχεδόν πάντα εμπροσθεν της φλέβας (προς το εσωτερικό του οφθαλμού – την υαλοειδική κοιλότητα).<sup>24</sup> Υποθετικά, η άκαμπτη – αρτηριοσκληρωτική αρτηρία συμπιέζει την υποκείμενη φλέβα, προκαλώντας στροβιλώδη ροή και ενδοθηλιακή βλάβη και ακολουθεί θρόμβωση του αυλού και απόφραξη φλέβας. Οι περισσότερες κλαδικές αμφιβληστροειδικές αποφράξεις συμβαίνουν άνω κροταφικά της θηλής, προφανώς λόγω μεγαλύτερης συχνότητας αρτηριοφλεβικών διασταυρώσεων στην περιοχή.

Σπανιότερα, τοπικές οφθαλμικές νόσοι, ειδικά φλεγμονώδους φύσης, μπορεί να προκαλέσουν δευτεροπαθή κλαδική θρόμβωση. Έχει περιγραφεί σε παθήσεις όπως τοξοπλάσμωση, νόσο Eales, σύνδρομο Αδαμαντιάδη - Behçet's και σε οφθαλμική σαρκοείδωση. Επίσης μακροανευρύσματα, νόσος Coats, τριχοειδικό αιμαγγείωμα και τα drusen της οπτικής θηλής μπορούν να προκαλέσουν θρόμβωση κλάδου αμφιβληστροειδικής φλέβας. Το γλαύκωμα είναι παράγοντας κινδύνου. Η κλαδική θρόμβωση είναι συνήθως ετερόπλευρη νόσος, με μόνο 9% των ασθενών να εκδηλώνουν αμφοτερόπλευρη προσβολή.<sup>11,12,19</sup>

Οι ασθενείς με κλαδική θρόμβωση φλέβας αμφιβληστροειδούς μπορεί να χάσουν όραση από ισχαιμία ωχράς, οίδημα ωχράς ή ενδοϋαλοειδική αιμορραγία.<sup>19</sup> Η εμφάνιση των συμπτωμάτων είναι συνήθως αιφνίδια, αλλά πολλοί ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί και άλλοι αναφέρουν σταδιακή επιδείνωση των συμπτωμάτων, προφανώς λόγω επιδείνωσης του οιδήματος στην ωχρά. Ο συμπτωματικός ασθενής εμφανίζεται με θάμβος όρασης ή απώλεια πεδίου όρασης και παθολογικά έχει τμηματική αιμορραγία.

Η κλινική πορεία ποικίλλει ανάλογα με την αρχική όραση, την παρουσία οιδήματος στην ωχρά, ισχαιμίας, νεοαγγείωσης και ενδοϋαλοειδικής αιμορραγίας. Πρέπει να γνωρίζουμε επίσης, ότι το 1/3 των ασθενών με οίδημα στην ωχρά και πρόσφατη θρόμβωση, μπορεί να βελτιώσει πάνω από 2 γραμμές Snellen χωρίς θεραπεία σε ένα χρόνο. Ακόμα, οι μισοί οφθαλμοί με εκτεταμένη θρόμβωση σε οφθαλμικό τεταρτημόριο ή ημισφαίριο συνδυάζουν παρουσία ισχαιμίας και από αυτούς οι μισοί θα αναπτύξουν νεοαγγείωση. Νεοαγγείωση δίσκου ή

αμφιβληστροειδούς μπορεί να αναπτυχθεί οποτεδήποτε μέσα στα πρώτα 3 χρόνια από τη θρόμβωση, συνηθέστερα όμως συμβαίνει τους πρώτους 6 – 12 μήνες.<sup>13</sup>

## **2.2. ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ**

Η θεραπευτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση της φλεβικής αποφρακτικής νόσου του αμφιβληστροειδή αποσκοπεί στη βελτίωση της αιμάτωσής του και στην πρόληψη και αντιμετώπιση των επιπλοκών που πιθανόν να εμφανιστούν με την πάροδο του χρόνου. Ο σκοπός αυτός μπορεί να επιτευχθεί είτε με συντηρητικά μέσα και φάρμακα, είτε με τη χρήση των ακτινών laser. Με τα φάρμακα και τις χημικές ουσίες προσπαθούμε να αποκαταστήσουμε την κυκλοφορία του αίματος μέσα στα αγγεία, να αυξήσουμε τη συγκέντρωση του οξυγόνου στον αμφιβληστροειδή και να ενισχύσουμε την αντοχή των νευρικών κυττάρων στην ισχαιμία.

### ***2.2.1. Για θρόμβωση κεντρικής φλέβας***

#### **2.2.1.1. Laser φωτοπηξία**

Σημαντική πληροφορία προέρχεται από τα αποτελέσματα της ‘The Central Vein Occlusion Study’ (CVOS), μιας μεγάλης προοπτικής πολυκεντρικής μελέτης που συνέκρινε τα αποτελέσματα της άμεσης προφυλακτικής παναμφιβληστροειδικής φωτοπηξίας (90 οφθαλμοί) χωρίς στοιχεία νεοαγγείωσης (ισχαιμική ΘΚΦ) με αυτά της στενής παρακολούθησης (91 οφθαλμοί). Η μελέτη έδειξε ότι η πρόωρη παναμφιβληστροειδική φωτοπηξία δεν προφυλάσσει την ανάπτυξη νεοαγγείωσης ίριδος ή γωνίας. Από την άλλη έδειξε ότι αν εμφανιστεί νεοαγγείωση ίριδος ή γωνίας, αυτή υποστρέφει κατά 90% αν οι ασθενείς υποβληθούν άμεσα σε φωτοπηξία.

Το δεύτερο ερώτημα που η CVOS διερεύνησε ήταν η αποτελεσματικότητα της φωτοπηξίας δίκην δικτύου για τη βελτίωση της οπτικής οξύτητας σε ασθενείς με μη ισχαιμικό οίδημα κεντρικής περιοχής και οπτική οξύτητα ίση ή μικρότερη από 20/50. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι, αν και υπήρξε σημαντική μείωση του οιδήματος στην ομάδα μελέτης, δεν υπήρξε κλινικά σημαντική διαφορά στην οπτική οξύτητα σε κανένα χρονικό σημείο παρακολούθησης.<sup>15,25</sup>

### 2.2.1.2. Αιμοδιάλυση

Η χρήση αιμοδιάλυσης στην θεραπεία της ΘΚΦ στηρίχθηκε στην παρατήρηση ότι κάποιοι ασθενείς είχαν διαταραχές στα ερυθρά, αυξημένη γλοιότητα αίματος, αυξημένο αιματοκρίτη ή ινωδογόνο. Θεωρήθηκε ότι μειώνοντας τον αιματοκρίτη ελαττώνεται το ιξώδες του πλάσματος, που οδηγεί σε βελτίωση της αμφιβληστροειδικής μικροκυκλοφορίας και διάχυσης. Η μέθοδος αυτή αν και δεν στερείται παρενεργειών (λήθαργος, δύσπνοια κλπ) χαρακτηρίζεται γενικά ασφαλής στους ηλικιωμένους ασθενείς. Υπάρχει σειρά εργασιών με ελπιδοφόρα αποτελέσματα, χωρίς να είναι στην πλειοψηφία τους όμως συγκρίσιμα, ενώ η θεραπεία αυτή απαιτεί ενδονοσοκομειακή θεραπεία, που δεν είναι πάντα εύκολη. Από την άλλη η μόνη τυχαιοποιημένη μελέτη που ερεύνησε αιμοδιάλυση σε εξονοσοκομειακή θεραπεία δεν έδειξε κάποιο όφελος.<sup>26</sup>

### 2.2.1.3. Ενδοϋαλοειδική Έγχυση Τριαμσινολόνης

Αυξημένο ενδιαφέρον έχει προκύψει τα τελευταία χρόνια στην αντιμετώπιση των φλεβικών θρομβώσεων με ενδοϋαλοειδική έγχυση τριαμσινολόνης. Η ιδέα βασίζεται στο γεγονός ότι η κύρια αιτία μείωσης της όρασης σε αυτούς τους ασθενείς είναι το οίδημα της ωχράς, που θεωρητικά μπορεί να ανταποκριθεί στη χορήγηση κορτικοστεροειδών.

Αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί πάνω στο αντικείμενο με συγκλίνοντα αποτελέσματα.

Παρατηρείται σημαντική μείωση του πάχους της ωχράς, όπως αυτό μετράται με OCT, που συνοδεύεται από αύξηση της οπτικής οξύτητας (χωρίς άμεση συνάφεια μεταξύ των δύο). Όμως, με την πάροδο του χρόνου αυτό το ευνοϊκό αποτέλεσμα αποδυναμώνεται, με το οίδημα να ανακάμπτει και την οπτική οξύτητα να επιδεινώνεται, αν και δε φτάνει στα προ της εγχύσεως χαμηλά επίπεδα.<sup>27</sup>

Για τη διατήρηση της βελτίωσης απαιτούνται επανειλημμένες εγχύσεις, ενώ η δοσολογία (2 – 20 mg), ο βέλτιστος χρόνος εφαρμογής της θεραπείας από την έναρξη της νόσου και το πλήθος των επαναλήψεων, είναι παράμετροι που χρειάζονται διερεύνηση και πιθανόν εξατομίκευση.

Η επιλογή των ασθενών είναι άλλο ένα ζήτημα, μιας και φαίνεται να είναι λιγότερο πιθανή η βελτίωση ασθενών με την ισχαιμική μορφή της νόσου και των

διαβητικών.<sup>28</sup>

Τα ποσοστά εμφάνισης σοβαρών επιπλοκών όπως η ενδοφθαλμίτιδα είναι εξαιρετικά χαμηλά, όμως η πρόκληση υπερτονίας είναι σημαντική (από μέση τιμή 14,4 mmHg, αύξηση στο 21,6 mmHg) αν και επίσης παροδική (15,3 mmHg στο πέρας της παρακολούθησης)· αφορά στο 50% ή και περισσότερο των ασθενών και απαιτεί φαρμακευτική ή σπανιότερα χειρουργική παρέμβαση.<sup>29</sup> Άλλο ένα αρνητικό είναι η επιτάχυνση της εξέλιξης του καταρράκτη, που όταν απαιτείται αφαίρεσή του υπάρχει κίνδυνος επιδείνωσης του οιδήματος της ωχράς.

#### 2.2.1.4. Ενδοϋαλοειδική Έγχυση Bevacizumab (Avastin)

Η θρόμβωση κεντρικής φλέβας αμφιβληστροειδούς σχετίζεται με αυξημένη παραγωγή VEGF (αυξητικός παράγοντας των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων) από τα ισχαιμικά κύτταρα του αμφιβληστροειδή, ενός παράγοντα που εμπλέκεται στην εγκατάσταση οιδήματος της ωχράς και ενοχοποιείται ως σημαντικός συντελεστής στην αλληλουχία γεγονότων που οδηγούν στην καταστροφική επιπλοκή της νεοαγγείωσης του προσθίου ημιμορίου.

Ένα ανασυνδυασμένο μονοκλωνικό αντίσωμα ενάντια στον VEGF, το bevacizumab (Avastin), που χρησιμοποιείται στην ογκολογία για την αντιμετώπιση όγκων του πεπτικού συστήματος, έχει αρχίσει προσφάτως να δοκιμάζεται και στην οφθαλμολογία με τη μορφή ενδοϋαλοειδικών εγχύσεων σε διάφορες παθήσεις όπου αναπτύσσονται νεοαγγειακά στοιχεία, όπως η χοριοειδική νεοαγγείωση, η παραγωγική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και η ΘΚΦΑ.

Τα πρώτα αποτελέσματα των ως τώρα λίγων και με μικρό αριθμό ασθενών δημοσιευμένων μελετών, είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά.<sup>30,31</sup> Καταδεικνύεται ταχεία μείωση της ήδη εγκατεστημένης νεοαγγείωσης, αποτροπή εμφάνισή της σε οφθαλμούς με σημαντική ισχαιμία και βελτίωση της οπτικής οξύτητας (πιθανά λόγω μείωσης του οιδήματος της ωχράς), τουλάχιστον σε βραχυπρόθεσμη παρακολούθηση.

Σοβαρές παρενέργειες όπως ενδοφθαλμίτιδα, δεν αναφέρονται, αλλά ούτε και αύξηση της ΕΟΠ που εμφανίζεται με την ενδοϋαλοειδική χορήγηση κορτιζόνης, χωρίς βέβαια να είναι τεκμηριωμένες οι μακροπρόθεσμες δράσεις του φαρμάκου.

### 2.2.1.5. Χοριοαμφιβληστροειδική Αναστόμωση

Η ιδέα της τεχνικής αυτής έχει σκοπό τη δημιουργία αναστόμωσης μεταξύ αμφιβληστροειδούς και χοριοειδούς, περιφερικά της θρόμβωσης, παρακάμπτοντας έτσι τη φλεβική στάση.

Πρωτοπαρουσιάστηκε από τους McAllister και Constable το 1995,<sup>32</sup> με την εφαρμογή ενός spot laser (50 μm, 0,1 sec, 1-4 W) που διαρρηγνύει το τοίχωμα μιας περιφερικής φλέβας και της υποκείμενης μεμβράνης του Bruch. Η τεχνική απέφερε επιτυχείς αναστομώσεις στο 33-63%, ποικίλη μεταβολή στην όραση και συχνές επιπλοκές, όπως αιμορραγίες, χοριοειδική νεοαγγείωση στο σημείο της αναστόμωσης, προαμφιβληστροειδική ίνωση, ισχαιμία και αποκόλληση.

Οι Leonard et al<sup>33</sup> επιχείρησαν τη δημιουργία αναστόμωσης χωρίς τρώση του φλεβικού τοιχώματος, με laser spots μικρότερης ενέργειας και μεγαλύτερης διάρκειας. Αναφέρονται 100% επιτυχείς αναστομώσεις, χωρίς σοβαρές επιπλοκές, πλην της εντοπισμένης προαμφιβληστροειδικής ίνωσης και βελτίωση της οπτικής οξύτητας κατά 5 γραμμές μέσο όρο, στο 84% των 19 ασθενών με μη ισχαιμική ΘΚΦΑ, που μελετήθηκαν για 4 έτη.

Κάποιοι συγγραφείς έχουν περιγράψει επιτυχείς αναστομώσεις με χειρουργικά μέσα, μετά από υαλοειδεκτομή και ευνοϊκά αποτελέσματα.<sup>34</sup>

### 2.2.1.6. Ακτινωτή Τομή του Οπτικού Νεύρου

Η υπόθεση ότι ο παθογενετικός μηχανισμός της κεντρικής θρόμβωσης είναι η συμπίεση της κεντρικής φλέβας από το σκληρικό δακτύλιο που περιβάλλει το οπτικό νεύρο στην έξοδό του από τον οφθαλμό, καθώς και η παρατήρηση ότι σε πολλές περιπτώσεις ο θρόμβος εντοπίζεται στο επίπεδο του ηθμοειδούς πετάλου, οδήγησε τους Orpencak et al<sup>35</sup> στην εφαρμογή μιας μικροχειρουργικής μεθόδου διατομής του δακτυλίου αυτού. Η τομή γίνεται κατά τη διάρκεια υαλοειδεκτομής, με τη χρήση ειδικής μικροχειρουργικής λόγχης.

Τα πιο πρόσφατα αποτελέσματα των μελετητών, σε μια σειρά 117 ασθενών, αναφέρουν βελτίωση της οπτικής οξύτητας κατά 2,5 γραμμές Snellen μέσο όρο στο 71% των ασθενών που υποβλήθηκαν σε επέμβαση και ανάπτυξη νεοαγγείωσης προσθίου ημιμορίου μόνο στο 6% αυτών.

Οι πιθανοί κίνδυνοι είναι η απώλεια του οπτικού πεδίου αντίστοιχα προς την

τομή (είτε λόγω μηχανικού τραυματισμού, είτε λόγω ισχαιμίας), η διατομή του αρτηριακού κύκλου των Zin-Haller (μειώνοντας την παροχή αίματος στο οπτικό νεύρο), ενώ έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις ανάπτυξης χοριοειδικής νεοαγγείωσης.

Ο αντίλογος στην εμβιομηχανική θεώρηση της μεθόδου, έρχεται κυρίως από τον Hayreh,<sup>36,37</sup> που δίνει έμφαση στο ότι το ηθμοειδές πέταλο είναι ένας άκαμπτος, συμπαγής σχηματισμός, ο οποίος δύσκολα μπορεί να αποσυμπιεστεί από μια απλή ακτινωτή τομή του νεύρου, ενώ ο θρόμβος μπορεί να εντοπίζεται σε άλλοτε άλλο σημείο της διαδρομής του νεύρου πίσω από το ηθμοειδές πέταλο. Επίσης σε μελέτη της αιματικής ροής των αμφ/κών αγγείων μετά την επέμβαση παρατηρήθηκε περαιτέρω μείωση της ροής.

Θεωρείται πιθανό ότι τα ευνοϊκά αποτελέσματα της μεθόδου σχετίζονται μάλλον με τη δημιουργία αναστόμωσης στο σημείο της τομής, παρά με την υποτιθέμενη αποσυμπίεση.

#### 2.2.1.7. Θρομβόλυση

Μετά την επιτυχημένη εφαρμογή της θρομβόλυσης με ιστικό ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (t-PA) στην καρδιολογία, αλλά και τα ευρήματα των ιστοπαθολογικών μελετών που τεκμηριώναν την ύπαρξη θρόμβου στην κεντρική φλέβα στο επίπεδο του ηθμοειδούς πετάλου ή οπισθοηθμοειδικά,<sup>38</sup> ακολούθησαν εφαρμογές θρομβολυτικών παραγόντων για τη θεραπεία της θρόμβωσης κεντρικής φλέβας του αμφιβληστροειδή.

Αρχικά επιχειρήθηκε από τον Elman συστηματική χορήγηση της ουσίας με πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα, γρήγορα όμως εγκαταλείφθηκε λόγω απειλητικών για τη ζωή επιπλοκών (εγκεφαλική αιμορραγία που οδήγησε σε θάνατο).<sup>39</sup>

Αργότερα, προκειμένου να αποφευχθούν οι συστηματικές παρενέργειες, δοκιμάστηκε ενδοϋαλοειδική έγχυση θρομβολυτικών παραγόντων<sup>40</sup> ενώ άλλοι συγγραφείς έπραξαν το ίδιο, εντός 3 ημερών από την εμφάνιση των συμπτωμάτων, όπου αναδείχτηκε βελτίωση της οπτικής οξύτητας σε 67 % των ασθενών, όχι όμως στους ασθενείς με ισχαιμική μορφή της νόσου.<sup>41</sup>

Οι Weiss και Byone<sup>42</sup> κατάφεραν τον εκλεκτικό καθετηριασμό κλαδικής φλέβας κατά τη διάρκεια υαλοειδεκτομής και έγχυση t-PA. Σε σειρά 28 οφθαλμών αναφέρθηκε βελτίωση οπτικής οξύτητας 3 ή περισσότερες γραμμές σε ποσοστό 54%, πιθανά και λόγω μηχανικής παρεκτόπισης του θρόμβου.

Σε άλλη μελέτη χρησιμοποιήθηκε υπερεκλεκτικός καθετηριασμός της οφθαλμικής αρτηρίας μέσω της μηριαίας και έγχυσης ουροκινάσης (28 ασθενείς) με ενθαρρυντικά αποτελέσματα.<sup>43</sup>

### **2.2.2. Για κλαδική θρόμβωση φλέβας.**

#### 2.2.2.1. Laser Treatment

Σημαντική πληροφορία μας δίνει η Branch Vein Occlusion Study (BVOS)<sup>12</sup> μιας μεγάλης προοπτικής πολυκεντρικής μελέτης που ανέφερε πως η φωτοπηξία με argon laser δίκην δικτύου (grid pattern) στην περιοχή του οιδήματος – διαρροής, επιτυχώς μείωσε την απώλεια όρασης από μη ισχαιμικό οίδημα ωχράς ασθενών με όραση 20/40 ή χειρότερη.

#### 2.2.2.2. Ενδοϋαλοειδική Έγχυση Τριαμσινολόνης

Από τη διεξαγωγή μελετών<sup>44,45</sup> για την ενδοϋαλοειδική χορήγηση τριαμσινολόνης σε ασθενείς με κλαδική θρόμβωση φλέβας, έχουν προκύψει δεδομένα παρόμοια σε ό,τι αφορά την αποτελεσματικότητα και τα ζητήματα ασφάλειας, με εκείνα των αντίστοιχων για τη θρόμβωση της κεντρικής φλέβας.

#### 2.2.2.3. Τομή του Κοινού Ελύτρου

Η προσέγγιση αυτή βασίζεται στην παρατήρηση ότι η κλαδική θρόμβωση φλέβας του αμφιβληστροειδή συμβαίνει στα σημεία αρτηριοφλεβικής διασταυρώσεως, όπου η πρόσθια εντόπιση της αρτηρίας σε σχέση με τη φλέβα και η ύπαρξη κοινού ελύτρου φαίνεται να έχουν ιδιαίτερη σημασία για την παθογένειά της.

Η ιδέα της διατομής του κοινού ελύτρου και ο διαχωρισμός του αρτηριδίου από το φλεβίδιο, έχει σκοπό την αποσυμπίεση του φλεβιδίου (στο 99% των



περιπτώσεων το αρτηρίδιο βρίσκεται εμπροσθεν του φλεβιδίου). Με τον τρόπο αυτό, θεωρητικά αίρεται η τοπική παρεμπόδιση και δίδεται δυνατότητα μετακίνησης του θρόμβου και αποκατάστασης της φλεβικής κυκλοφορίας.

Η πρώτη εφαρμογή της μεθόδου έγινε το 1988 από τους Osterloh και Charles<sup>46</sup> ενώ έντεκα χρόνια αργότερα σε δημοσίευσή τους, οι Opremcak και Bruce<sup>47</sup> αναφέρουν βελτίωση της οπτικής οξύτητας στο 67 % των ασθενών.

Σε συγκριτική μελέτη της "χειρουργικής υαλοειδεκτομής και τομής του κοινού ελύτρου", με εφαρμογή "grid laser" και "απλή παρακολούθηση", καταδείχθηκε σαφές πλεονέκτημα σε ό,τι αφορά τη βελτίωση της όρασης των χειρουργηθέντων ασθενών και ως προς τα δύο άλλα groups ασθενών (κέρδος 4,5 γραμμές Snellen, έναντι 2,0 και 1,1 αντίστοιχα).<sup>48</sup>

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν και κάποιες μελέτες που συγκρίνουν την τεχνική της τομής του κοινού ελύτρου με απλή υαλοειδεκτομή και πρόκληση αποκόλλησης του οπίσθιου υαλώδους χωρίς τομή του κοινού ελύτρου, που δείχνουν εξίσου καλά αποτελέσματα στη μείωση του οιδήματος με οποιαδήποτε από τις δύο επεμβάσεις,<sup>49</sup> γεγονός που τονίζει τη σημασία της κατάστασης του οπίσθιου υαλώδους για την πρόγνωση των ασθενών αυτών.

Συνδυασμός της μεθόδου με ενδοϋαλοειδική έγχυση rtPA αναφέρεται να έχει επίσης καλά αποτελέσματα, με το 70% των ασθενών να κερδίζουν τρεις τουλάχιστον γραμμές Snellen, μείωση του οιδήματος ωχράς, ενώ έμφαση δίνεται στην έγκαιρη παρέμβαση, προκειμένου να επιτευχθεί το βέλτιστο αποτέλεσμα.<sup>50</sup> Πρόσφατες εργασίες που μελετούν τη μεταβολή αιμοδυναμικών αγγειογραφικών παραμέτρων, όπως η ροή αίματος (RBF) στο προσβεβλημένο φλεβίδιο και ο αρτηριοφλεβικός χρόνος διέλευσης (AVP), δείχνουν βελτίωση της ροής μετεγχειρητικά στην πλειοψηφία των ασθενών, που παραμένουν βελτιωμένες ακόμη και 1 έτος μετά την επέμβαση, ενδεικτικές αποκατάστασης της βατότητας του αγγείου.

#### 2.2.2.4. Αντιαγγειογενετικά (bevacizumab)

Αυξημένο ενδιαφέρον εμφανίζεται τα τελευταία χρόνια για τη δράση των αντιαγγειογενετικών στη θεραπεία του οιδήματος ωχράς σε έδαφος κλαδικής θρόμβωσης αμφιβληστροειδικής φλέβας.<sup>51,52</sup> Παρόλο που αυτές οι εργασίες δείχνουν μέχρι στιγμής ενθαρρυντικά ανατομικά (βιομικροσκόπηση, οπτική τομογραφία

συνοχής, φλουροαγγειογραφία) και λειτουργικά αποτελέσματα (οπτική οξύτητα), στερούνται σημαντικού χρόνου παρακολούθησης, αλλά και ομάδας ελέγχου.

### **3. ΘΡΟΜΒΩΣΗ**

Φυσιολογικά όταν το αίμα βγει από τα αγγεία, πήζει. Πήξη: μετατροπή μιας διαλυτής πρωτεΐνης του πλάσματος (ινωδογόνο) σε αδιάλυτο ινώδες, τα μόρια του οποίου πολυμερίζονται και δίνουν γένεση στο σχηματισμό ενός τρισδιάστατου πλέγματος, της ινικής, στις βρογχίδες του οποίου εγκλωβίζονται τα έμμορφα συστατικά του αίματος. Η πήξη του αίματος έχει μεγάλη σημασία για το σταμάτημα της αιμορραγίας. Το αίμα όμως μπορεί να πήξει και μέσα στα αγγεία εν ζωή και η ιδιότητά του αυτή δεν φαίνεται να εξυπηρετεί καμία φυσιολογική λειτουργία. Η πήξη του αίματος μέσα στα αγγεία εν ζωή λέγεται **θρόμβωση** και το προϊόν της πήξης **θρόμβος**.

#### ***3.1. Μηχανισμοί θρόμβωσης***

Τρεις είναι κυρίως οι παράγοντες που ευθύνονται για το παθολογικό φαινόμενο της θρόμβωσης (τριάδα του Virchow): 1) η αλλοίωση του αγγειακού τοιχώματος και ιδίως του ενδοθηλίου, 2) η διαταραχή της ροής του αίματος, και 3) η αλλοίωση της σύστασης και επομένως στην πηκτικότητα του αίματος. Η βλάβη του ενδοθηλίου αξιολογείται ως σημαντικότερος παράγοντας, που και μόνος του μπορεί να προκαλέσει θρόμβωση. Απ' ότι φαίνεται τη μεγαλύτερη σημασία γι' αυτό έχει η αποκάλυψη του υποενδοθηλιακού κολλαγόνου, που αποτελεί τη βασική ουσία και θέση προσκόλλησης των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μηχανισμού της πήξης. Οι διαταραχές στη ροή αντιστοιχούν είτε σε επιβράδυνση και στάση, είτε σε περιδίγιση του αίματος και φαίνεται να είναι τελείως απαραίτητες για τη φλεβική θρόμβωση. Αυτές οι διαταραχές φαίνεται να δρουν μέσα από α) την καταστροφή της αξονικής στοιβάδευσης των στοιχείων του αίματος, με αποτέλεσμα την άμεση επαφή των αιμοπεταλίων με το ενδοθήλιο, β) το μικροτραυματισμό του ενδοθηλίου από τις δίνες του αίματος, γ) την παρεμπόδιση της αραίωσης των παραγόντων πήξης, και δ) τη μη απομάκρυνση τυχόν μικροθρόμβων με αποτέλεσμα

τη συσσώρευση και μεγέθυνσή τους στις θέσεις στάσης. Οι διαταραχές της σύστασης είναι κυρίως οι καταστάσεις υπερπηκτικότητας του αίματος, που παρατηρούνται κυρίως σε παθήσεις όπως το νεφρωσικό σύνδρομο, ο διαβήτης, η χρόνια λήψη οιστρογόνων κλπ. Σ' όλες αυτές τις καταστάσεις έχει βρεθεί σε ποικίλλουσα αναλογία, αύξηση του αριθμού ή της προσκολλητικότητας των αιμοπεταλίων, αύξηση του ινωδογόνου και αύξηση παραγόντων πήξης (VII, VIII, IX, X).

### 3.2. Σύσταση του θρόμβου

Ο κάθε θρόμβος αποτελείται από στοιχεία του αίματος, που η αναλογία τους καθώς και η διάταξή τους διαφέρουν ανάλογα με τις συνθήκες δημιουργίας του θρόμβου. Κύρια συστατικά τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα αιμοπετάλια και η ινική.

### 3.3. Εξέλιξη των θρόμβων

Ένας θρόμβος είναι δυνατό να υποστεί τις παρακάτω τρεις εξελίξεις: α) να ρευστοποιηθεί και να διαλυθεί με την κινητοποίηση του ινωδολυτικού μηχανισμού. Αυτό συνήθως συμβαίνει στις πρώτες ημέρες, προφανώς γιατί η νεοσχηματισθείσα ινική λύεται πολύ πιο εύκολα, β) **είναι δυνατόν να οργανωθεί με τη συμμετοχή ινοκυτταρικών στοιχείων, που εξορμώνται από το τοίχωμα των αγγείων. Περιέχουν πλέον πολυμερισμένη ινική, ινοβλάστες, αιμοπετάλια και λευκοκύτταρα. Είναι δυνατό νεόπλαστα αγγεία να αναστομώνονται μεταξύ τους, να διευρύνονται και να βρίσκουν διέξοδο μέσα στο θρόμβο. Αυτό ονομάζεται σπράγγωση ή επανασπράγγωση του θρόμβου, και έχει αποτέλεσμα τη μερική αποκατάσταση της κυκλοφορίας του αίματος στο θρομβωμένο αγγείο,** γ) ένας θρόμβος είναι δυνατό να αποσπασθεί αυτούσιος ή κατά τμήματα και να προκαλέσει εμβολή (συνηθέστερα για τις εν τω βάθει θρομβώσεις των κάτω άκρων).<sup>53</sup>

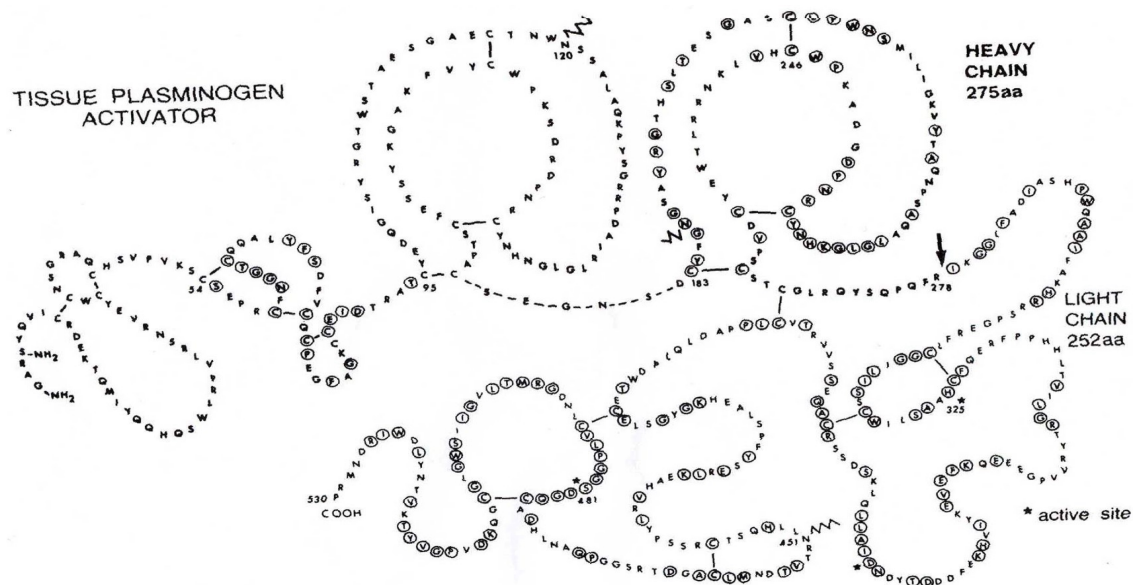
Οι Green et al<sup>38</sup> αναφέρουν σε ιστοπαθολογικά ευρήματα 29 οφθαλμών με θρόμβωση κεντρικής φλέβας του αμφιβληστροειδή 3 περιπτώσεις (10,3%) με φρέσκο θρόμβο και 26 (89,7%) με επανασπράγγωση. Ο πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων ήταν έκδηλο εύρημα σε 14 (48,3%) περιπτώσεις, ενώ η χρόνια φλεγμονή στην περιοχή του θρόμβου παρατηρήθηκε σε άλλους 14 (48,3%) ασθενείς.

#### **4. ΘΡΟΜΒΟΛΥΣΗ**

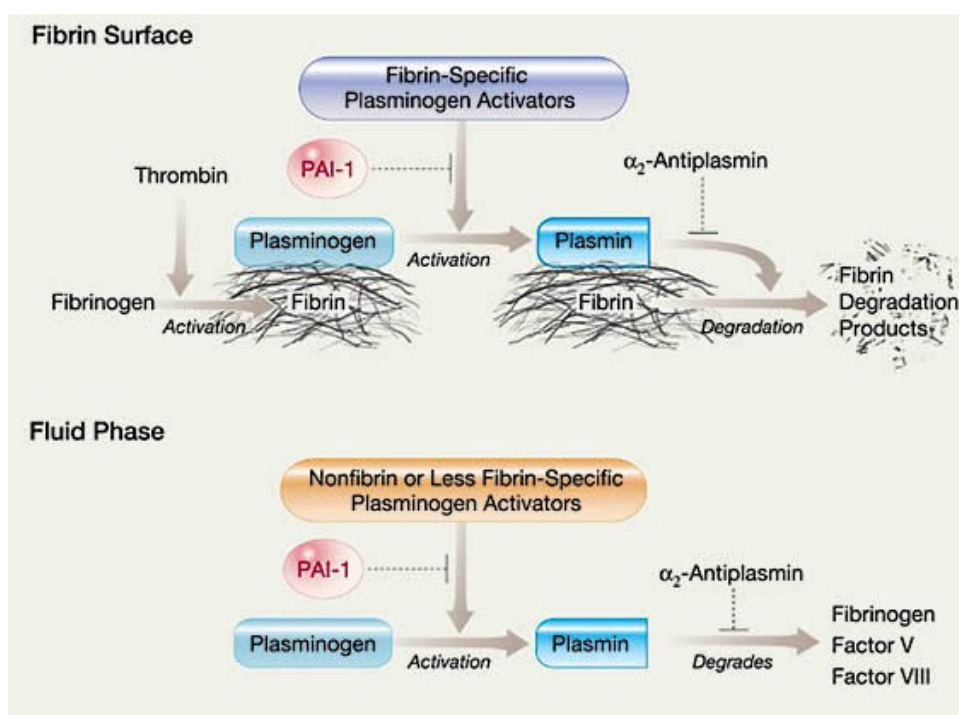
**Θρομβόλυση (fibrinolysis)** : σύνολο βιολογικών φαινομένων με σκοπό την αποδόμηση του ινώδους σε μικρού μοριακού βάρους διαλυτά προϊόντα, τα προϊόντα διάσπασης του ινώδους

Το αιμοποιητικό σύστημα των θηλαστικών εμπεριέχει ένα ενζυμικό σύστημα ικανό για την λύση των θρόμβων αίματος και των εναποθέσεων ινικής στους ιστούς. Το ινωδολυτικό σύστημα είναι μια από τις πολλές πρωτεολυτικές οδούς που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση της πήξης του αίματος και το κυριότερο ένζυμο - ικανό για την αποδόμηση – απορρόφηση της ινικής, είναι η **πλασμίνη**. Η πλασμίνη είναι μια μη ειδική πρωτεάση που αποδομεί την ινική, άλλα υποστρώματα όπως το ινωδογόνο και πρωτεΐνες από τον θρόμβο.

Η μετατροπή του πλασμινογόνου, ανενεργού προενζύμου της πλασμίνης στο ενεργό ένζυμο, πραγματοποιείται (καταλύεται) από πολλούς ενεργοποιητές του πλασμινογόνου (plasminogen activators-PAs): τύπου ουροκινάσης, ιστικού τύπου και εξαρτώμενη από επαφή. Ο ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (tissue-type plasminogen activator-tPA), είναι μια γλυκοπρωτεΐνη (πρωτεάση σερίνης) 68 KD – 530 αμινοξέα, που συντίθεται κυρίως στο ενδοθήλιο των αγγείων και μπορεί να έχει μορφή μονής ή διπλής αλυσού (η A- αλυσος συνδέεται ισχυρά με το ινώδες, ενώ η B- αλυσος έχει κύρια καταλυτική δραστηριότητα).<sup>54</sup>



Ιστικού τύπου ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (tPA)



Εικόνα 17. Το ινωδολυτικό σύστημα. Το πλασμινογόνο μετατρέπεται με ενδογενείς ή εξωγενείς ενεργοποιητές σε πλασμίνη, που με τη σειρά του αποδομεί την ινική<sup>55</sup>

Με χρωματογραφία διακρίνονται δυο μορφές t-PA (I και II). Η περιεκτικότητα του πλάσματος σε t-PA είναι περίπου 5 ng/mL και από αυτό το περισσότερο είναι συζευγμένο με αναστολέα πλασμινογόνου-1 (PAI-1, plasminogen

activator inhibitor) και μόνο το 5% κυκλοφορεί σε ελεύθερη μορφή. In vivo και οι δυο μορφές t-PA έχουν βιολογική ημιπερίοδο 5 min. Φαίνεται ότι η ημιπερίοδος αυτή δεν έχει σχέση με αδρανοποίηση του t-PA από τον PAI-1, επειδή σε ασθενείς που αντιμετωπίζονται με ανασυνδυσμένο t-PA (που συνήθως χορηγείται σε συγκεντρώσεις 100 φορές υψηλότερες από τον PAI-1) η ημιπερίοδος είναι επίσης 5 min.<sup>56</sup> Αυτό σημαίνει ότι 20 min μετά τη χορήγηση, η στάθμη του στο πλάσμα είναι μικρότερη του 10% της αρχικής τιμής.

Σε απουσία ινικής το t-PA είναι σχετικά ανενεργό. Η ενδογενής ινωδόλυση εξαρτάται από την παρουσία ινικής και γι' αυτό δεν οδηγεί σε συστηματική ινωδόλυση. Το t-PA έχει παρασκευαστεί ως φάρμακο και κυκλοφορεί σε εμπορική μορφή (βλέπε παρακάτω).

Έχει ήδη δειχθεί η χρησιμότητα του φαρμάκου στην καρδιολογία σε δόσεις 35 – 50 mg ενδοφλέβια,<sup>57,58</sup> ενώ τα τελευταία έτη αναζητούνται – εφαρμόζονται βελτιωμένοι παράγοντες, όπως η ρετεπλάση.<sup>59,60</sup> Άλλες εφαρμογές του t-PA σε πλαστική χειρουργική,<sup>61</sup> καρκίνο δέρματος, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο,<sup>62,63</sup> εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση,<sup>64</sup> σε καθετήρες περιτοναϊκής διάλυσης,<sup>65</sup> στη νεφρική ανεπάρκεια αλλά και σε μεταμοσχεύσεις νεφρού,<sup>66</sup> ενώ στην οφθαλμολογία έχει χρησιμοποιηθεί συστηματικά<sup>39</sup> και με καθετηριασμό στην αρτηριακή και φλεβική αποφρακτική νόσο,<sup>43</sup> αλλά και σε υποωχρική αιμορραγία σε έδαφος σχετιζόμενης με την ηλικία εκφύλισης της ωχράς.<sup>67</sup>

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η συμπεριφορά του t-PA όταν ενεθεί στην υαλοειδική κοιλότητα. Υπάρχουν ευρήματα στην βιβλιογραφία που συνηγορούν για εγκλωβισμό του φαρμάκου σε υαλοειδικούς χώρους,<sup>68</sup> αλλά και απενεργοποίηση του από τους αναστολείς (PAs) που είναι παρόντες,<sup>69</sup> ενώ από την άλλη υπάρχει πληροφορία ότι το φάρμακο περνά στα αμφιβληστροειδικά αγγεία μετά ενδοϋαλοειδική ένεση σε πειραματικό μοντέλο.<sup>70</sup>

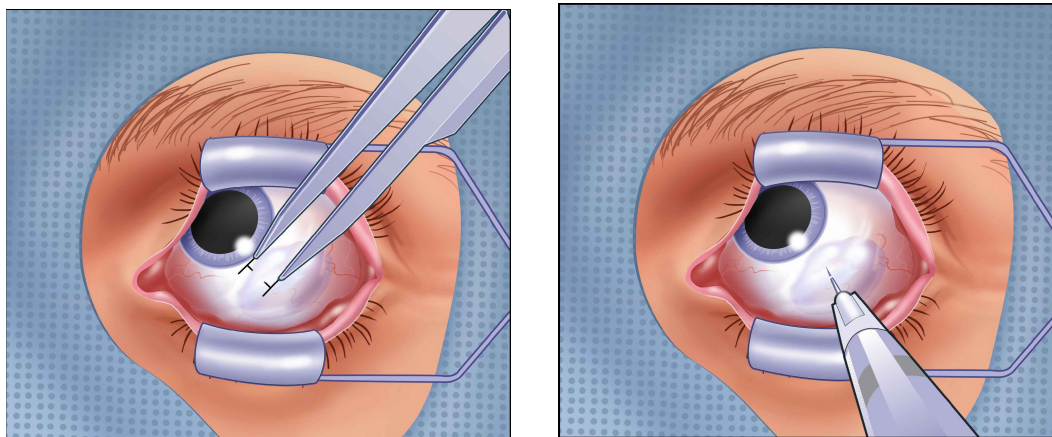
**Alteplase**, είναι η κοινή ονομασία του ανασυνδυσμένου ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, που παράγεται με DNA τεχνολογία. Στην Ελλάδα το φάρμακο t-PA έχει την εμπορική ονομασία **Actilyse** (Boehringer Ingelheim, Germany) και κυκλοφορεί σε συσκευασία – δόση των 50 mg, με ένδειξη το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και την πνευμονική εμβολή, για ενδονοσοκομειακή χρήση. Η μέγιστη δόση χορήγησης είναι 50 – 100 mg και χορηγείται ενδοφλέβια. Το Actilyse πρέπει να χορηγείται όσο το δυνατό συντομότερα από την έναρξη των συμπτωμάτων για τις παραπάνω παθήσεις.

Κύριες **αντενδείξεις** είναι ο υψηλός κίνδυνος αιμορραγίας όπως γνωστή αιμορραγική διάθεση, χρήση άλλων αντιπηκτικών από το στόμα, πρόσφατη αιμορραγία, πρόσφατη χειρουργική επέμβαση, ιστορικό εγκεφαλικού επεισοδίου (αιμορραγικού), ενδοκαρδίτιδα, παγκρεατίτιδα, έλκος στομάχου κ.α. Η πιο συχνή **ανεπιθύμητη ενέργεια** είναι η αιμορραγία.

#### **4.1. Ενδοϋαλοειδικές ενέσεις**

Η ύπαρξη του αιματο-αμφιβληστροειδικού φραγμού εμποδίζει σειρά φαρμάκων να περάσουν από τη συστηματική κυκλοφορία στον οφθαλμό και να επιτύχουν θεραπευτικά επίπεδα στον ιστό στόχο, τον αμφιβληστροειδή. Από την άλλη εμποδίζει τη συστηματική απορρόφηση φαρμάκων που ενίονται στην υαλοειδική κοιλότητα, και κατά συνέπεια τις παρενέργειές τους: επιτρέπεται μ' αυτόν τον τρόπο να λειτουργήσει ο υαλοειδικός χώρος ως *reservoir* φαρμάκων. Ο οφθαλμός είναι επίσης ανοσολογικά «προνομιούχος» χώρος, γιατί περιορίζει την πιθανότητα έντονης αλλεργικής αντίδρασης σε αντιγόνα. Από την άλλη όμως υπάρχει αλληλεπίδραση με την όραση. Η προσιτότητα – εύκολη πρόσβαση του οφθαλμού, η σχετική απομόνωσή του από τη συστηματική κυκλοφορία αλλά και οι σοβαρές παρενέργειες που προκαλούν σε συστηματική χορήγηση σειρά φαρμάκων, όπως η κορτιζόνη, ο ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου και τα αγγειογενετικά οδήγησε σε ιδιαίτερη ανάπτυξη την τεχνική των ενδοϋαλοειδικών ενέσεων ως τρόπο χορήγησης φαρμάκων για οφθαλμική χρήση.

Η ενδοϋαλοειδική ένεση εισήχθη πρώτη φορά ως τεχνική από τον Ohm το 1911 για εισαγωγή αέρα στην υαλοειδική κοιλότητα για εσωτερικό επιποματισμό στην αποκατάσταση αποκόλλησης αμφιβληστροειδούς.<sup>71</sup> Εισαγωγή φαρμάκων στην υαλοειδική κοιλότητα εφαρμόστηκε αρχικά στα μέσα της δεκαετίας 1940 για χορήγηση πενικιλίνης για θεραπεία ενδοφθαλμίτιδας.<sup>73,74</sup> Τα τελευταία χρόνια εφαρμόζεται ευρέως με την ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών αλλά και φαρμάκων όπως τριαμκινολόνη, αντιαγγειογενετικά.



Εικόνα 18. Οι ενδοϋαλοειδικές ενέσεις πραγματοποιούνται με λεπτή βελόνη (27 – 30 g) δια της pars plana, 3,5 – 4 mm από το σκληροκερατοειδικό όριο, όπου η βελόνα μπορεί να εισέλθει στην υαλοειδική κοιλότητα χωρίς να τραυματίσει τον αμφιβληστροειδή

#### ***4.1.1. Προβλήματα που σχετίζονται με τις ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις***

##### Το Υαλώδες

Είναι μια υδρογέλη που γεμίζει το χώρο μεταξύ φακού και αμφιβληστροειδή. Διαχωρίζεται από τον κρυσταλλοειδή φακό και τον οπίσθιο θάλαμο με την πρόσθια υαλοειδική μεμβράνη και συνδέεται με τον αμφιβληστροειδή. Έχει υψηλή περιεκτικότητα σε νερό (98 - 99,7%) και pH περίπου 7,5. Αποτελείται ακόμα από κολλαγόνο, υαλουρονικό οξύ και υαλοκύτταρα που εντοπίζονται συχνότερα στην pars plana.

Σε παθολογικές καταστάσεις οι φαρμακοκινητικές παράμετροι αλλάζουν: σε μελέτη των Coco et al<sup>10</sup> μελετήθηκε η φαρμακοκινητική της βανκομυκίνης μετά ενδοϋαλοειδική ένεση σε φυσιολογικούς και επιμολυσμένους οφθαλμούς κονίκλων. Ο χρόνος ημιζωής της βανκομυκίνης ήταν 69 ώρες στο φυσιολογικό υαλώδες και 14,53 ώρες στο φλεγμένον υαλώδες.

Δυο βασικά προβλήματα περιορίζουν την **εφαρμογή των ενδοϋαλοειδικών θεραπειών**. Πρώτον πολλοί παράγοντες – φάρμακα έχουν ταχύτατη κάθαρση στο



υαλώδες, και για να διατηρηθεί θεραπευτικό επίπεδο φαρμάκου απαιτούνται επαναλαμβανόμενες ενέσεις, που αυξάνουν την πιθανότητα επιπλοκών όπως ενδοφθαλμίτιδα, βλάβη στον φακό και αποκόλληση αμφιβληστροειδούς. Δεύτερον πολλά φάρμακα, ενέχουν τοπική τοξικότητα στους οφθαλμικούς ιστούς, καθώς η αποτελεσματική δόση εισάγει επιπλοκές όπως τοξικότητα επί του αμφιβληστροειδή, αλλά και καταρράκτη, αστιγματισμό, υαλοειδική αιμορραγία, αποκόλληση αμφιβληστροειδούς, ενδοφθαλμίτιδα, υπέρτονια – γλαύκωμα, υποτονία, αγγειακά επεισόδια, υαλίτιδα κα.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η συμπεριφορά διαφόρων φαρμάκων (πχ t-PA) όταν ενεθούν στην υαλοειδική κοιλότητα. Υπάρχουν ευρήματα στην βιβλιογραφία που συνηγορούν για εγκλωβισμό του φαρμάκου σε υαλοειδικούς χώρους: οι Carreras Egana et al<sup>68</sup> ανέφεραν σε πειραματικό μοντέλο κονίκλων ότι το υαλώδες περιορίζει την ελεύθερη κυκλοφορία φαρμάκου στην υαλοειδική κοιλότητα (μετά από ενδοϋαλοειδική ένεση tPA)· άλλοι συγγραφείς ανέφεραν απενεργοποίηση του από τους αναστολείς (plasminogen activator inhibitors – PAIs) που είναι παρόντες.<sup>69</sup> Αντίθετα, οι Mahmoud et al<sup>70</sup> έδειξαν ότι το tPA περνά στα αμφιβληστροειδικά αγγεία μετά υαλοειδική ένεση σε πειραματικό μοντέλο θρόμβωσης σε χοίρειους οφθαλμούς.

Στην κλινική πράξη, ο περιορισμός της διακίνησης ενός φαρμάκου στον ιστό στόχο αλλά και η απενεργοποίησή του μπορεί να οδηγήσουν σε αποτυχία μια θεραπεία.

Γι' αυτούς τους λόγους προέκυψε η ανάγκη για την ανάπτυξη συστημάτων παρατεταμένης χορήγησης οφθαλμολογικών φαρμάκων, για την θεραπεία χρόνιων οφθαλμικών παθήσεων όπου η συστηματική θεραπεία συνδυάζεται με ανεπιθύμητες επιπλοκές.

## **5. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΠΑΡΑΤΕΤΑΜΕΝΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ**

Εκτός από τη φλεβική αποφρακτική νόσο του αμφιβληστροειδή σειρά άλλων παθήσεων εντοπίζονται στο οπίσθιο ημιμόριο του οφθαλμού, όπως η σχετιζόμενη με την ηλικία εκφύλιση της ωχράς, η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η οπίσθια ραγοειδίτιδα και αμφιβληστροειδίτιδα και προκαλούν σοβαρή απώλεια όρασης. Η εντόπιση των παθήσεων αυτών καθιστά την τοπική χορήγηση – ενστάλαξη φαρμάκων να έχει πολύ περιορισμένη αξία, καθώς αυτή η οδός χορήγησης σπάνια επιτυγχάνει θεραπευτικά επίπεδα φαρμάκων στον ιστό – στόχο (χοριοειδή – αμφιβληστροειδή). Από την άλλη πλευρά, οι επαναλαμβανόμενες για πολύ διάστημα ενδοϋαλοειδικές ενέσεις αυξάνουν την πιθανότητα επιπλοκών, όπως ενδοφθαλμίτιδα, καταρράκτης, ενδοϋαλοειδική αιμορραγία, αποκόλληση κλπ.

Πρόσφατες εξελίξεις στην τεχνολογία της χορήγησης φαρμάκων οδήγησαν στην ανάπτυξη νέων παραγόντων – τρόπων χορήγησης, για τη θεραπεία παθήσεων του αμφιβληστροειδή, χοριοειδή και ωχράς.<sup>74</sup> Εμπορικά σκευάσματα έχουν ήδη αναπτυχθεί (implants) όπως το μη απορροφήσιμο ganciclovir implant<sup>75</sup> (Vitrasert; Bausch & Lomb, Rochester, New York, USA) για θεραπεία της αμφιβληστροειδίτιδας από κυτταρομεγαλοϊό σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς. Το Retisert (Envision TD) είναι ένα ενδοφθάλμιο ένθεμα - σύστημα παρατεταμένης χορήγησης ακετονικής φλουοκινολόνης (fluocinolone acetonide), για τη θεραπεία χρόνιας – μη λοιμώδους ραγοειδίτιδας και ενθέεται στο οπίσθιο ημιμόριο του οφθαλμού.<sup>76</sup> Σε κλινικές μελέτες διερευνάται ένα βιοαποδομήσιμο ένθεμα δεξαμεθαζόνης (Posurdex; Allergan Inc., Irvine, California, USA) για τη θεραπεία ραγοειδίτιδας και διαβητικού οιδήματος ωχράς.<sup>77</sup>

Έχει μελετηθεί η σύνδεση φαρμάκου σε **μικροσφαιρίδια ή νανοσφαιρίδια** που τοποθετούνται με ένεση ενδοφθάλμια ή περιοφθάλμια,<sup>79, 80</sup> όπου το φάρμακο εγκαψυλιώνεται σε μικροκάψουλες (1–1000 μm) ή νανοκάψουλες (1–1000 nm) μαζί με βιοαποδομήσιμα ή μη απορροφήσιμα πολυμερή. Τα μικροσφαιρίδια δρουν ως reservoir μετά την ενδοϋαλοειδική ένεση και αυξάνουν πολύ το χρόνο παραμονής στο υαλώδες.

**Η διασκληρική ιοντοφόρηση**<sup>74</sup> είναι μια πολλά υποσχόμενη τεχνική (ασκείται ένα ασθενές ηλεκτρικό ρεύμα που οδηγεί φορτισμένα μόρια μέσω του

σκληρού στον χοριοειδή – αμφιβληστροειδή και υαλώδες) και τέλος, **τα λιποσώματα** εισάγουν ένα νέο τρόπο παρατεταμένης αποδέσμευσης – χορήγησης φαρμάκου.

## **5.1. ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ**

### ***5.1.1. Ορισμοί***

Είναι η μικρότερη σφαιρική δομή που μπορεί να παραχθεί τεχνητά από φυσικά – μη τοξικά φωσφολιπίδια<sup>1</sup> και χοληστερόλη. Μπορούν να έχουν μια ευμετάβλητη δομή και σύσταση και γι' αυτό, ποικιλία εφαρμογών. Διαφέρουν από τα μικύλια στο γεγονός ότι στα λιποσώματα τα φωσφολιπίδια οργανώνονται σε διπλοστιβάδες που σχηματίζουν κλειστές σφαιρικές δομές συνήθως πολύστιβες.<sup>81</sup>

Τα λιποσώματα είναι κυστικά (φυσαλίδες) συστήματα λιπιδίων με διάμετρο που ποικίλλει από 50nm μέχρι λίγα μm. Επιτρέπουν την εγκύστωση σε αυτά είτε υδατοδιαλυτών φαρμάκων σε υδατικό διάλυμα, είτε λιποφιλικών φαρμάκων σε μεμβράνη. Αυτά τα λιπιδιακά κυστίδια (vesicles) είναι βιοδιασπώμενα. Το κύριο συστατικό των λιποσωμάτων είναι τα φωσφολιπίδια, ενώ σε μερικές περιπτώσεις χρησιμοποιούνται σφιγγολιπίδια. Ως πρόσθετα συστατικά μπορεί να περιέχουν χοληστερόλη (μέχρι 30 mol%) και ένα φορτισμένο λιπίδιο (θετικό ή αρνητικό) (π.χ. φωσφατιδυλσερίνη, φωσφατιδυλγλυκερόλη, στερυλαμίνη)


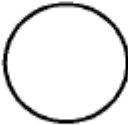


### ***5.1.2. Ιδιότητες***

Τα λιποσώματα μπορούν να παρασκευασθούν με διαφορετικά χαρακτηριστικά, ποικίλλοντας στο περιεχόμενο λιπιδίου, το μέγεθος, το φορτίο επιφανείας και τη μέθοδο παρασκευής.<sup>82</sup> Οι κύριοι διαφορετικοί τύποι που μπορεί να παρασκευαστούν είναι: μονόστιβα (μικρά ή μεγάλα: small or large unilamellar vesicles, SUV or LUV) και πολύστιβα (multilamellar vesicles, MLV).

---

<sup>1</sup> Φωσφολιπίδια: αμφίφυλα μόρια αποτελούμενα από ένα πολικό άκρο (κεφαλή) και ένα υδρόφοβο (ουρά) (ακυλικές άλυστοι διαφορετικού μεγέθους λιπαρών οξέων). Σε υδατικό περιβάλλον σχηματίζουν διπλοστιβάδες.

A. Bochot *et al.***Liposome model**

			
DENOMINATION	Large unilamellar vesicles LUV	Multi- or Oligolamellar vesicles MLV/OLV	Small unilamellar vesicles SUV
DIAMETER (nm)	80-1000	100-4000	20-80

Πίνακας 1. Λιποσωμιακά μοντέλα και διαφορετικά μοντέλα λιποσωμάτων : μέγεθος και μορφολογία (Bochot A et al, Prog Retin Eye Res. 2000 Mar;19(2):131-47)

Στα χαρακτηριστικά ενός φαρμάκου εντάσσονται η κινητική του (απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός, απέκκριση), η φαρμακολογική δράση στην περιοχή – ιστό – στόχο και τέλος οι παρενέργειες – τοξικότητα.

#### Φορείς (carriers) για επιλεκτική χορήγηση φαρμάκων.

Τα λιποσώματα μελετούνται πάνω από 20 έτη για ενδοϋαλοειδική χορήγηση. Εμφανίζονται να είναι χρήσιμοι φορείς για παρατεταμένη χορήγηση φαρμάκων για πολλούς λόγους:

- είναι βιοσυμβατά και βιοαποδομήσιμα
- έχουν ελάχιστη αντιγονική δράση
- αποτελούνται από λιπίδια όμοια με αυτά των βιολογικών μεμβρανών
- έχουν σταθερή μεμβράνη που μπορεί να υποστεί σοβαρή παραμόρφωση χωρίς ρήξη
- μπορούν να εγκαταλιώσουν – ενσωματώσουν υδρόφιλα, λιπόφιλα και αμφίφιλα φάρμακα
- μπορούν να φέρουν ακριβείς ποσότητες φαρμάκων σε ευρύ φάσμα επιθυμητών συγκεντρώσεων
- μπορεί να εγκλωβιστεί μεγάλη ποσότητα φαρμάκου ανά μονάδα όγκου
- επιτυγχάνεται παράταση του χρόνου αποδέσμευσης ως αποτέλεσμα **διάχυσης** του φαρμάκου μέσω πολυάριθμων φωσφολιπιδικών μεμβρανών
- το μέγεθος τους διασφαλίζει ότι παραμένουν εντοπισμένα στην περιοχή της ένεσης
- προστατεύουν το εγκυστωμένο φάρμακο από τη μεταβολική αποδόμηση
- μπορούν να παρασκευαστούν σε στείρο περιβάλλον
- μπορούν να ενεθούν σε υγρή μορφή μέσω ενέσεων 27- ή 30- gauge, ακόμα κι αν η διάμετρος των λιποσωμάτων μπορεί να είναι μεγαλύτερη από τον αυλό της βελόνας
- παρέχουν αργή αποδέσμευση φαρμάκου, χωρίς να διαταράσσονται τα διακριτά χαρακτηριστικά του

Αλληλεπιδρούν με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος και με ειδικές αναγνωριστικές πρωτεΐνες, τις οψονίνες. Έτσι οι HDL πλάσματος ( Plasma High Density Lipoproteins) αφαιρούν τα μόρια φωσφολιπιδίων από την κυστική δομή. Οι οψονίνες είναι ειδικές ανοσολογικές πρωτεΐνες που ενώνονται με ξένα σώματα και προάγουν τη φαγοκυττάρωση.

Εφαρμογές:

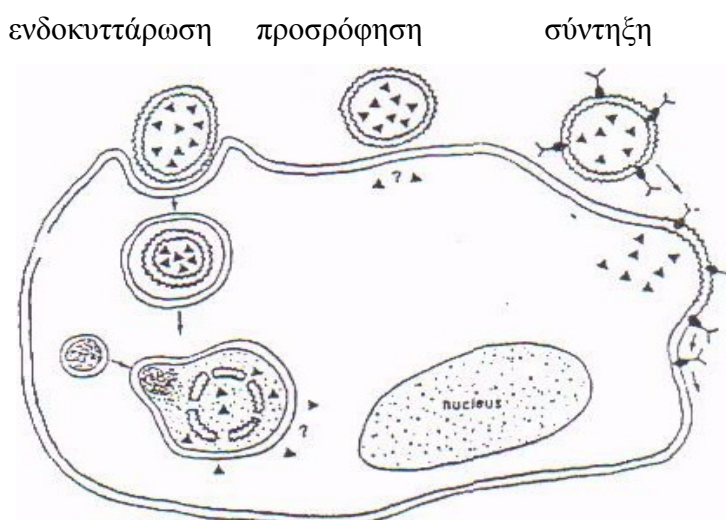
- καρκινική χημειοθεραπεία
- αντιμικροβιακή χημειοθεραπεία
- θεραπεία ηπατικών μεταστάσεων / στοχοποίηση ηπατοκυττάρων
- χορήγηση – targeting πλασμιδίων, ολιγονουκλεοτιδίων (gene therapy)

- διαδερμική απορρόφηση φαρμάκων
- εμβόλια
- διαγνωστική απεικόνιση

–

### 5.1.3. Αλληλεπίδραση λιποσωμάτων – κυττάρων

- ανταλλαγή ουσιών με τις κυτταρικές μεμβράνες (λιπίδια – πρωτεΐνες) (intermembrane transfer)
- προσρόφηση (adsorption) – προσκόλληση λιποσωμάτων στα κύτταρα
- ενδοκυττάρωση (endocytosis) ή φαγοκυττάρωση των λιποσωμάτων
- σύντηξη (fusion) των λιποσωμάτων (μετά την προσκόλληση) με την κυτταρική μεμβράνη



Εικόνα 19. Αλληλεπίδραση λιποσωμάτων – κυττάρων.

Ως ενδοϋαλοειδική θεραπεία ο «εγκλωβισμός» φαρμάκων σε λιποσώματα μελετήθηκε κυρίως για αύξηση της δράσης του φαρμάκου στην περιοχή στόχο, μέσω αύξησης της χορηγούμενης συνολικής δόσης, δρώντας ως σύστημα παρατεταμένης χορήγησης. Έχει ήδη αποδειχθεί σε σειρά φαρμάκων (αντιβιοτικά, αντικά, αντιμυκητιασικά και αντιμεταβολίτες)<sup>83</sup> ότι αν χορηγηθούν ενδοϋαλοειδικά εγκλωβισμένα σε λιποσώματα, αυξάνουν καθαρά τον χρόνο ημίσειας ζωής, αλλά και μειώνονται οι παρενέργειες και η τοξικότητα τους σε σχέση με τη χορήγηση της ελεύθερης μορφής του. Η μείωση της τοξικότητας εξηγείται με την μικρότερη δόση

φαρμάκου που παραμένει σε ελεύθερη μορφή – σε άμεση επαφή με τον ιστό στόχο (η μεγαλύτερη ποσότητα παραμένει εντός των λιποσωμάτων και αποδεσμεύεται αργά, κυρίως με διάχυση). Η σύσταση του λιποσώματος και το μέγεθος αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για την τροποποίηση της φαρμακοκινητικής του εγκυστωμένου φαρμάκου σε σχέση με το ελεύθερο φάρμακο μετά ενδοϋαλοειδική χορήγηση.

Έχει δειχθεί ότι τα μεγάλα μονόστιβα λιποσώματα (Large Unilamellar Vesicles - LUV) δεν διαπερνούν την έσω αφοριστική μεμβράνη - ILM,<sup>84</sup> ενώ με τη χρήση λιποσωμάτων που εγκλωβίζουν σωματίδια κολλοειδούς χρυσού δείχθηκε πως τα λιποσώματα μένουν προσκολλημένα στην έσω αφοριστική, αλλά δεν ευρίσκονται στις εσώτερες αμφιβληστροειδικές στιβάδες. Ως εκ τούτου μπορεί να υποτεθεί πως σε περίπτωση χορήγησης φαρμάκων εγκλωβισμένων σε λιποσώματα, μόνο τα φάρμακα στην ελεύθερη τους μορφή, έχουν την πιθανότητα να διαπεράσουν στους οφθαλμικούς ιστούς.

**Πιθανά μειονεκτήματα:** μετά ενδοϋαλοειδική χορήγηση εμφανίζονται μικρές λευκωπές λαμπυρίζουσες υαλοειδικές θολερότητες, ιδίως στις κατώτερες ώρες. Αυτό σε συνδυασμό με τη γρήγορη διασπορά των λιποσωμάτων στην υαλοειδική κοιλότητα μπορεί να προκαλέσει θόλωση, μειώνοντας την οπτική οξύτητα του ασθενούς, αλλά και τη δυνατότητα του ιατρού για πλήρη κλινική εξέταση (βυθοσκόπηση).

Εμπορική Ονομασία / Εταιρεία	Κοινόχρηστη Ονομασία	Ένδειξη
Epaxal, Berna Biotech	Vaccine	Hepatitis A
AmBisome, Fujisawa Healthcare	Amphotericin B	Antifungal
Abelcet, Wyeth Pharmaceuticals	Amphotericin B	Antifungal
DaunoXome, Gilead Sciences, Inc	Daunorubicin	Kaposi's sarcoma
Doxil, Ortho Biotech Products LP	Doxorubicin	Kaposi's sarcoma
Myocet, Sopherion	Doxorubicin	Metastatic breast cancer
Visudyne, Novartis Ophthalmics	Verteporfin	Age-related macular degeneration

Πίνακας 2. Εμπορικά σκευάσματα σε λιποσώματα

**Συνοψίζοντας**, σύμφωνα με την τρέχουσα θεραπευτική πρακτική δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία για τη φλεβική θρόμβωση του αμφιβληστροειδή, που να οδηγεί σε επανα-αγγείωση του θρομβωμένου αγγείου, είτε αφορά την κεντρική φλέβα, είτε κάποιον από τους κλάδους της. Η τρέχουσα αντιμετώπιση των ασθενών αυτών είναι παρακολούθηση, ενώ γίνεται θεραπευτική παρέμβαση μόνο μετά την εμφάνιση επιπλοκών όπως η νεοαγγείωση (αμφιβληστροειδούς, οπτικού δίσκου, ίριδος ή γωνίας), η ενδοϋαλοειδική αιμορραγία και το οίδημα της ωχράς κηλίδας. Ως αποτέλεσμα η πρόγνωση όρασης ασθενών με θρομβωτικά επεισόδια είναι συχνά πολύ φτωχή, ιδίως όταν στην παθολογία συμμετέχει η ωχρά κηλίδα. Επιπρόσθετα, οι νεότερες ελπιδοφόρες προσπάθειες δεν έχουν υποστεί ακόμα την αξιολόγηση των τυχαιοποιημένων, διπλών – τυφλών μελετών.

Η ίδια η παρουσία τόσο πολλών θεραπειών, δεικνύει την απουσία ευρέως αποδεκτής θεραπείας. Από την άλλη, δεν μπορεί να παραγνωριστεί το γεγονός των περισσότερων δυνατοτήτων που παρέχονται σήμερα με την εξέλιξη της τεχνολογίας αλλά και την είσοδο νέων φαρμάκων.

Η εξέλιξη της μικροχειρουργικής και ειδικότερα της υαλοειδεκτομής έδωσε τη δυνατότητα να πραγματοποιούνται επεμβάσεις αδιανόητες πριν από λίγα χρόνια, όπως ο καθετηριασμός αμφιβληστροειδικών αγγείων με έγχυση φαρμάκων, η ακτινωτή τομή του οπτικού νεύρου, η τομή του κοινού ελύτρου. Οι επεμβάσεις αυτές έχουν είτε υψηλό κόστος σε εξοπλισμό είτε δύσκολη καμπύλη εκμάθησης, για να καθιερωθούν ως εφαρμόσιμες μέθοδοι στην καθημερινή ιατρική πράξη. Οι φαρμακευτικές θεραπείες θρομβόλυσης σε ενδοφλέβια χορήγηση παρότι έδειξαν αποτελεσματικότητα, εμφάνισαν βαριές επιπλοκές, μη αποδεκτές για την οφθαλμολογική πράξη.<sup>39</sup>

Η θεραπεία με ενδοϋαλοειδικές ενέσεις στεροειδών και αντιαγγειογενετικών, παρόλο που φαίνεται να βελτιώνουν την κλινική εικόνα, δεν αποκαθιστούν τη ροή του αποφραγμένου αγγείου, ενώ οι ενέσεις θρομβολυτικών δεν έχουν καλά αποτελέσματα σε ασθενείς με άσχημη πρόγνωση (ισχαιμική μορφή).

Στην παρούσα διατριβή, στο **κλινικό μέρος** και αφού λάβαμε υπόψιν τα σύγχρονα βιβλιογραφικά δεδομένα, **αξιολογήσαμε την εφαρμογή ιστικού**



**ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (tPA) μετά υαλοειδεκτομή, σε ασθενείς με πρόσφατη θρόμβωση αμφιβληστροειδικής φλέβας (κεντρικής και κλαδικής),** αίροντας μ' αυτόν τον τρόπο πιθανούς αρνητικούς παράγοντες στην κινητική του φαρμάκου στην υαλοειδική κοιλότητα. Η υαλοειδεκτομή είναι μια τεχνική ευρέως διαδεδομένη στην οφθαλμολογική πράξη διεθνώς και δεν απαιτεί επιπλέον καμπύλη εκμάθησης για ένα οφθαλμίατρο χειρουργό οπισθίου ημιμορίου.

#### **Στο πειραματικό μέρος,**

1. αναπτύξαμε πειραματικό μοντέλο φωτοδυναμικής θρόμβωσης επιπολής ωτιαίων αγγείων, αλλά και αμφιβληστροειδών αγγείων σε κονίκλους, και αξιολογήσαμε τη φυσική της πορεία.
2. αξιολογήσαμε σε σειρά πειραματόζωων (κονίκλων) την ικανότητα του ενδοϋαλοειδικού tPA να βελτιώνει τη φυσική πορεία της νόσου.
3. αναπτύξαμε (σε συνεργασία με το τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου της Πάτρας) τροποποιημένο tPA, εγκλωβισμένο σε λιποσώματα, και αξιολογήσαμε την ενδοϋαλοειδική του εφαρμογή στο περιγραφέν μοντέλο. τέλος,
4. αξιολογήσαμε με ανοσοϊστοχημεία την ικανότητα του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (με και χωρίς λιποσώματα), να διαπερνά και να αναγνωρίζεται ενδοαγγειακά σε αμφιβληστροειδικά αγγεία, μετά από ενδοϋαλοειδική ένεση σε οφθαλμούς κονίκλων.

## **B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## **1. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ**

## **1.1.ΚΛΙΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **ΣΚΟΠΟΣ**

Η κλινική μελέτη, λαμβάνοντας υπόψιν τα βιβλιογραφικά δεδομένα και με τη χρήση νέας τεχνικής που περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω, είχε σκοπό να:

**αξιολογήσει την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια της ενδοϋαλοειδικής εφαρμογής του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου μετά υαλοειδεκτομή και να διερευνήσει εάν βελτιώνει την πορεία ασθενών με πρόσφατη απόφραξη φλέβας του αμφιβληστροειδή, σε σχέση με τη φυσική πορεία της νόσου.**

#### ***1.1.1. ΤΟ ΦΑΡΜΑΚΟ***

##### Ανασυνδυσασμένος Ιστικός Ενεργοποιητής Πλασμινογόνου

Το Alteplase (**Actilyse**, Boehringer Ingelheim, Germany) είναι ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου, που παράγεται με τεχνολογία ανασυνδυασμού DNA. Είναι μια στείρα κεκαθαρμένη γλυκοπρωτεΐνη 527 αμινοξέων. Συντίθεται από το

συμπληρωματικό DNA (cDNA) για ανθρώπινο t-PA, από κυτταρική σειρά μελανώματος ανθρώπου. Η διαδικασία παραγωγής περιλαμβάνει την έκκριση του ενζύμου στο καλλιεργητικό μέσο από κυτταρική σειρά θηλαστικών (ωάρια κινέζικου χάμστερ) όπου με γενετική μηχανική έχει εισαχθεί το συμπληρωματικό DNA του alteplase. Η διαδικασία της ζύμωσης ολοκληρώνεται σε μέσο (θεραπευτικό υλικό) που περιλαμβάνει το αντιβιοτικό γενταμυκίνη σε 100 mg/L, που όμως δεν αναγνωρίζεται στο τελικό προϊόν.

Είναι μια στείρα, λευκή – υπόλευκη σκόνη για ενδοφλέβια χορήγηση μετά ανασυνδυασμό με στείρο ενέσιμο νερό (Water for Injection). Βρίσκεται στο φαρμακείο σε συσκευασία φιαλιδίου με 2333 mg ενέσιμης ξηράς ουσίας που περιέχουν 50 mg rt-PA και φιαλίδιο με 50 ml διαλύτη (στείρο ενέσιμο νερό).

Έχει διάρκεια ζωής ως λυόφιλο προϊόν μέχρι 36 μήνες σε ψυγείο (2 – 8 °C), ενώ μετά την ανασύσταση μπορεί να παραμείνει σε ψύξη μέχρι 24 ώρες και σε θερμοκρασία δωματίου (μικρότερη των 25 °C) για 8 ώρες.

### **1.1.2. ΟΙ ΑΣΘΕΝΕΙΣ**

Το πρωτόκολλο της κλινικής μελέτης υποβλήθηκε στο Επιστημονικό Συμβούλιο του ΠαΓΝΗ, και εγκρίθηκε τον Απρίλιο του 2002.

#### 1.1.2.1. κριτήρια εισόδου στη μελέτη

-

1. ασθενείς με θρόμβωση κλάδου φλέβας ή κεντρικής φλέβας του αμφιβληστροειδή
2. ηλικία ασθενούς μεγαλύτερη από 65 έτη
3. διάρκεια της θρόμβωσης μικρότερη από 1 μήνα
4. οπτική οξύτητα μικρότερη από 0,3 (κλίμακα Snellen) για τους ασθενείς με κλαδική θρόμβωση φλέβας, και
5. οπτική οξύτητα μικρότερη από 0,1 (κλίμακα Snellen) για τους ασθενείς με θρόμβωση κεντρικής φλέβας του αμφιβληστροειδή

### 1.1.2.2. κριτήρια αποκλεισμού

1. ηλικία μικρότερη από 65 έτη
2. θρομβωτικά επεισόδια με οπτική οξύτητα μεγαλύτερη από 0,3
3. διάρκεια – έναρξη επεισοδίου μεγαλύτερη από 1 μήνα
4. θολά μέσα για επιτέλεση φλουοραγγειογραφίας (πχ θόλωση κερατοειδή, καταρράκτης κλπ)
5. αλλεργία σε θρομβολυτικό παράγοντα ή στη φλουορεσκεΐνη
6. προδιάθεση σε αιμορραγία
7. ένδειξη για άμεση γνωστή θεραπεία (πχ νεοαγγείωση ίριδος ή αμφιβληστροειδή, γλαύκωμα κλπ)
8. οποιαδήποτε άλλη αδυναμία για παρακολούθηση σε βάθος χρόνου

### 1.1.2.3. Παρακολούθηση

Η προεγχειρητική εκτίμηση περιλάμβανε οπτική οξύτητα, τονομέτρηση, έλεγχο στη σχισμοειδή λυχνία, γωνιοσκοπία, βιομικροσκοπηση βυθού και φλουοροαγγειογραφία. Όλοι οι ασθενείς ενημερώθηκαν αναλυτικά για τη φύση της επέμβασης και τους κινδύνους και έγγραφη συγκατάθεση δόθηκε από όλους. Οι ασθενείς μετεγχειρητικά αξιολογήθηκαν (με όλες τις παραπάνω εξετάσεις) την πρώτη μετεγχειρητική μέρα, την 1<sup>η</sup> εβδομάδα, τον 1<sup>ο</sup>, 3<sup>ο</sup>, 6<sup>ο</sup> μήνα και στη συνέχεια ανά εξάμηνο (εκτός της φλουοραγγειογραφίας που δεν επαναλήφθηκε την 1<sup>η</sup> μετεγχειρητική μέρα).

### 1.1.2.4. Αξιολόγηση

Κύριος δείκτης αξιολόγησης (main outcome measure) για όλους τους ασθενείς ήταν η πορεία της οπτικής οξύτητας μετεγχειρητικά, ενώ δευτερεύοντες δείκτες (secondary outcome measure) ήταν η παρουσία επιπλοκών και η ανάγκη επανεπέμβασης.

#### 1.1.2.5. Η επέμβαση (χειρουργική τεχνική)

Όλοι οι ασθενείς χειρουργήθηκαν με την ίδια τεχνική από ένα χειρουργό (ΜΚΤ). η χειρουργική τεχνική περιλάμβανε:

1. μυδρίαση του οφθαλμού προς επέμβαση
2. οπισθοβόλβια αναισθησία με διάλυμα 1 : 1 ξυλοκαΐνης 2% και βουπιβακαΐνης 5%
3. αποστείρωση της περιοφθάλμιας περιοχής και των βλεφάρων με ιωδιούχο ποβιδόνη 10%, και των κολπωμάτων του επιπεφυκότα με διάλυμα 5 %
4. παρασκευή επιπεφυκότα (υπό χειρουργικό μικροσκόπιο, Leica M844)
5. υαλοειδεκτομή 3 πυλών εισόδου 20 gauge, 3.8 mm από το σκληροκερατοειδές όριο (Bausch &Lomb, Millennium)
6. αν το οπίσθιο υαλώδες δεν είχε αποκολληθεί (φαινόμενο συχνό σε ηλικιωμένους), διενέργεια αποκόλλησης της οπίσθιας υαλοειδικής μεμβράνης)
7. ανταλλαγή υγρού – αέρα
8. ένθεση 50 µg t-PA από ανασυνδυασμένο ιστικό ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (rt-PA, Actilyse, Boehringer Ingelheim, Germany) διαλυμένο σε 0,5 ml φυσιολογικό ορό (normal saline), στην υαλοειδική κοιλότητα σε περιβάλλον αέρα<sup>i</sup>
9. συρραφή σκληροτομών – επιπεφυκότα με ράμμα 7/0 vicryl
10. όλοι οι ασθενείς εξήλθαν του χειρουργείου με αυστηρή οδηγία για ύπτια θέση τις πρώτες 6 μετεγχειρητικές ώρες.

---

<sup>i</sup> η ένθεση υγρού σε κοιλότητα (σφαιρική) σε πλήρωση με αέρα, οδηγεί λόγω βαρύτητας αυτή να εντοπίζεται στις κατώτερες ώρες, λόγω βαρύτητας. Ο ασθενής παραμένοντας σε ύπτια θέση, κατακρατά την δραστική ουσία (tPA) άνωθεν της περιοχής της θρόμβωσης (οπτικός δίσκος, οπίσθιος πόλος)

## **1.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ**

Στο σημείο αυτό αναφέρεται η βασική μεθοδολογία μας για το πειραματικό μέρος. Εξειδικεύσεις των μεθόδων αναφέρονται στα επιμέρους πειράματα, όπως αυτά περιγράφονται παρακάτω

### ***1.2.1. Πειραματόζωα***

Όλα τα πειράματα έγιναν σε μοντέλο κονίκλου, μέσου βάρους 2800 – 3100 γραμμάρια. Μια από τις σημαντικότερες διαφορές από τον οφθαλμό των πρωτεύοντων είναι ότι δεν έχει ωχρά όπως ο ανθρώπινος οφθαλμός. Προσφέρει πλεονεκτήματα, όπως ικανοποιητικός όγκος οφθαλμού για οφθαλμολογικό χειρισμό και παρακολούθηση, εύκολη αναισθησία και διεγχειρητικό χειρισμό, αλλά και εύκολη παρακολούθηση οφθαλμού με συμβατικά μέσα (μικροσκόπιο, απλή βυθοσκόπηση, φλουοραγγειογραφία κλπ). Επιπλέον στο εργαστήριό μας υπάρχει εμπειρία στην ιστολογία οφθαλμού τέτοιων πειραματόζωων.

Στα περισσότερα πειράματα, προτιμήθηκαν θηλυκά κουνέλια με χρωστική.

Όλα τα πειράματα και η επαφή με τα πειραματόζωα έγινε υπό τις συνθήκες και προϋποθέσεις που ορίζει η «Δήλωση του ARVO για τη Χρήση των Πειραματόζωων στην Οφθαλμολογική Έρευνα» (ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research). Όλα τα πειραματόζωα σε όλη τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης, διαβίωναν σε δικό τους χώρο, σε περιβάλλον κατάλληλο, καθαρό, με τακτική τροφή (Οίκος Πειραματόζωων Πα.Γ.Ν.Η.).



### 1.2.1.1. Αναισθησία – Θανάτωση

Όλες οι επεμβάσεις – πειραματικές παρεμβάσεις, έγιναν σύμφωνα με την "ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research" και χρήση υποδόριας **αναισθησίας**, με συνδυασμό υδροχλωρικής κεταμίνης 20 – 25 mg/kg ΒΣ (Imalgene 1000, Merial, France) και υδροχλωρικής ξυλαζίνης (Rombun, Bayer AG, Leverkusen, Germany) σε δόσεις 10 mg/kg ΒΣ.

Η **θανάτωση** πραγματοποιήθηκε με ενδοφλέβια πεντοθάλη. Οι ενδοφλέβιες χορηγήσεις έγιναν με παρακέντηση της επιπολής περιφερικής ωτιαίας φλέβας του κονίκλου.

### **1.2.2. Το Πειραματικό Μοντέλο Θρόμβωσης**

Επιλέχθηκε το πειραματικό μοντέλο της φωτοδυναμικής θρόμβωσης. Η **φωτοδυναμική θεραπεία (PDT)** είναι μια θεραπεία στην οποία χορηγείται μια μη τοξική ευαίσθητη στο φως ουσία (**φωτοευαισθητοποιητής**), η οποία στη συνέχεια ενεργοποιείται με έκθεση σε φως και ασκεί φωτοχημική δράση σε μια περιοχή στόχο. Το φως ακτινοβολείται επιλεκτικά στην περιοχή στόχο. Η ακτινοβολία ασκείται σε επιλεγμένο μήκος κύματος που εμφανίζει την μέγιστη απορρόφηση ο φωτοευαισθητοποιητής που μεταπίπτει σε μια διεγερμένη κατάσταση και παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου ( $^1\text{O}_2$ ,  $^3\text{O}_2$ ,  $^-\text{O}_2$ ) με πολύ μικρό χρόνο ημιζωής: nano- έως microseconds· αυτό εξηγεί τον περιορισμένο χώρο δράσης, μόνο στην περιοχή ακτινοβολίας. Οι πιθανοί βιολογικοί στόχοι του singlet oxygen και των ελευθέρων ριζών: νουκλεϊκά οξέα, ένζυμα, κυτταρικές μεμβράνες, οδηγούν σε κυτταρική βλάβη και τέλος σε κυτταρικό θάνατο. Ειδικότερα η αγγειακή βλάβη οδηγεί σε στάση κυκλοφορίας και τέλος σε αγγειακή απόφραξη.

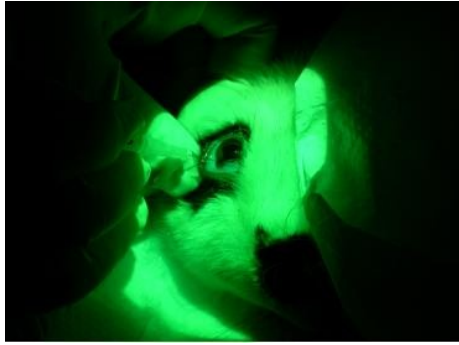
Επιλέχθηκε ο φωτοευαισθητοποιητής 2<sup>ης</sup> γενιάς τετρασουλφονιωμένη χλωροαργιλική **φθαλοκυανίνη** (chloro-aluminum sulfonated phthalocyanine) σε ενδοφλέβια χορήγηση. Η βιβλιογραφία έχει δείξει σε προηγούμενα πειράματα ότι η επαρκής δόση φθαλοκυανίνης για να επιτευχθεί φωτοδυναμική θρόμβωση αμφιβληστροειδικών αγγείων είναι 4-6 mg/Kg ΒΣ φθαλοκυανίνης,<sup>85, 86, 87, 88</sup> και γι' αυτό στα πειράματά μας χρησιμοποιήσαμε δόση 5mg/kg. Αμέσως μετά την ενδοφλέβια χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή (υπό υποδόρια αναισθησία που περιγράφεται παραπάνω), τα μεγάλα παραθηλαία αμφιβληστροειδικά αγγεία (αγγειακός μίσχος) των κουνελιών ακτινοβολήθηκαν με ένα **διοδικό laser στα 670 nm**, για χρόνο λιγότερο από 4 λεπτά σε όλες τις περιπτώσεις, ή και λιγότερο, μέχρι να έχουμε βιομικροσκοπικά την εικόνα της απόφραξης της ροής.

Σε αρχική σειρά πειραμάτων, δοκιμάστηκε ο νεότερος φωτοευαισθητοποιητής β' γενιάς Verteporfin (Visudyne), που χρησιμοποιείται σε ανθρώπους για θεραπεία σχετιζόμενης με την ηλικία εκφύλισης της ωχράς, σε μοντέλα θρόμβωσης αυτιού αλλά και οφθαλμού. Εγκαταλείφθηκε στη συνέχεια για λόγους υψηλού κόστους, αλλά και εκλεκτικότητας στο χοριοειδικό ιστό, γεγονός που προκαλούσε μεγάλες χοριοειδικές αποκολλήσεις.

Συγκεκριμένα, **μετά από ενδοφλέβια χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή (βερτεπορφίνη ή φθαλοκυανίνη) στην κατάλληλη δόση, ακτινοβολείται η περιοχή – αγγεία στόχος με αντίστοιχου μήκους κύματος laser (690 nm για το Visudyne, 670 nm για την φθαλοκυανίνη, και για χρόνο 5 λεπτά ή και λιγότερο μέχρι την οπτική επιβεβαίωση της διακοπής της ροής του ακτινοβολούμενου αγγείου. Οι ενδοϋαλοειδικές ενέσεις ακολουθούσαν τη θρόμβωση, στα 1,5mm από το σκληροκερατοειδές όριο του κουνελιού.**



Εικόνα 19. Φωτογραφίες από πειράματα. Αρ: φλεβοκέντηση επιπολής ωτιαίας φλέβας. Δε: ακτινοβολήση με laser αμφιβληστροειδικών αγγείων κουνελιού.



Ενδοϋαλοειδική ένεση σε οφθαλμό κουνελιού.

### *1.2.3. To Laser*

Στα αρχικά πειράματα θρόμβωσης αμφιβληστροειδούς με Visudyne) χρησιμοποιήθηκε το laser Visulas 690s ενσωματωμένο σε σχισμοειδή λυχνία Zeiss SL120 της εταιρείας Carl Zeiss Meditec.

Στη συνέχεια για τα πειράματα φωτοθρόμβωσης με φθαλοκυανίνη χρησιμοποιήθηκε το διοδικό laser (R670-350G-JAC, Intelite, Inc. USA), με μέγιστη ισχύ εξόδου 350 mW και εκπομπή στα 670 +/- nm (class IIIb). Έγινε ρύθμιση και βαθμονόμηση της εξόδου από τον **Χ. Γκίνη** στο Ινστιτούτο Οπτικής και Όρασης του Πανεπιστημίου Κρήτης και ειδικότερα:

**Πίνακας 3.** Αποτελέσματα μετρήσεων ισχύος εξόδου του διοδικού laser **R670-350G-JAC**.

Ισχύς εξόδου συναρτήσει της θέσης του ποτενσιόμετρου.

Θέση	Ισχύς (mW)
1	5.66667
2	6
3	20.33333
4	54.66667
5	88.33333
6	124.33333
7	162.66667
8	215
9	279
10	292.66667



Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θέση ποτενσιόμετρου 2 – 3.

#### 1.2.4. Ο Θρομβολυτικός Παράγοντας (*t-PA, Actilyse*)

Χρησιμοποιήθηκε και εδώ ο ανασυνδυασμένος ιστικός ενεργοποιητής πλασμινογόνου, το alteplase (**Actilyse**, Boehringer Ingelheim, Germany), που έχει περιγραφεί με λεπτομέρεια στη μεθοδολογία του κλινικού μέρους, αλλά και στο γενικό μέρος. Στην πειραματική σειρά το φάρμακο αραιώθηκε περισσότερο, με φυσιολογικό ορό, σε τελικές δόσεις και συγκεντρώσεις που περιγράφονται σε κάθε πείραμα.

### 1.2.5. Ενκαψυλίωση – εγκλωβισμός t-PA σε λιποσώματα

(Η εργασία πραγματοποιήθηκε στο Φαρμακευτικό Τμήμα του Πανεπιστημίου της Πάτρας, υπεύθ. Αναπλ. Καθηγ. Σοφία Αντιμησιάρη, και η παρασκευή των λιποσωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα από τον δρ. Σπυρίδων Μουρτά)

Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική λυοφιλοποίησης – ανασύστασης (αποξήρανσης – επανα-υδάτωσης, Dehydration-Rehydration Vesicles-DRV)<sup>89</sup> η οποία είναι ειδική για τον εγκλωβισμό ευαίσθητων μορίων σε λιποσώματα. DRV μέθοδος: Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στη μέθοδο “Gregoriadis-Kirby” που περιλαμβάνει:

λυοφιλοποίηση μίγματος διασποράς προσχηματισμένων άδειων μικρών μονοστιβαδιακών λιποσωμάτων (SUV –small unilamellar vesicles) και της υπό εγκλωβισμό ουσίας και επακόλουθη ελεγχόμενη ενυδάτωση. Τα λιποσώματα που λαμβάνονται αναμένονται να είναι ολιγοστοιβαδικά και ανομοιογενή από άποψη διασποράς μεγέθους, με υψηλό ποσοστό εγκλωβισμού της υδατοδιαλυτής ουσίας.

Συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν 1. μεγάλα πολυστοιβαδικά λιποσώματα (MLV) με τη μέθοδο ενυδάτωσης λεπτού υμενίου, 2. μικρά μονοστοιβαδικά λιποσώματα (SUV) με την τοποθέτηση του δείγματος σε ακίδα υπερήχων (Sonics-vibra cell) για περίπου 20 min, αλλά και σε διάφορες μορφές λιπιδιακής σύστασης: PC liposomes: φωσφατιδυλχολίνη (phosphatidylcholine), DMPC (di-myristoylglycero-PC), DPPC (dipalmitoylglycero-PC), DSPC (di-stearoylglycero-PC), και PG: φωσφατιδυλγλυκερόλη (phosphatidylglycerol).

Ακολούθησε ο διαχωρισμός ελεύθερου-εγκλωβισμένου με τη μέθοδο της φυγοκέντρωσης σε ψηλές στροφές. Τα λιποσώματα καταβυθίστηκαν, ενώ το υπερκείμενο που περιέχει το ελεύθερο t-PA αποχύθηκε. Τέλος, τα λιποσώματα επαναιωρήθηκαν στον αρχικό όγκο με ρυθμιστικό διάλυμα.

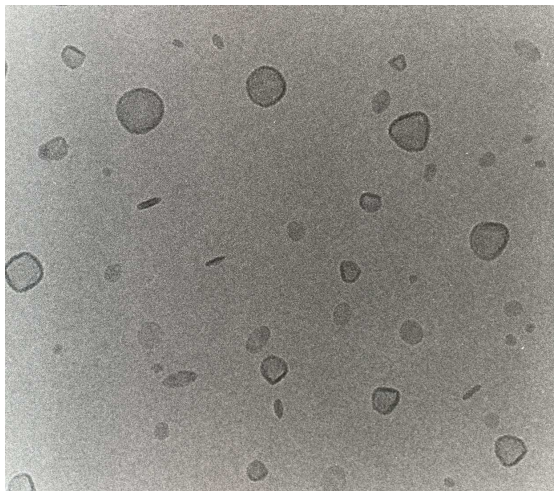
Η μέτρηση της δραστηριότητας του λιποσωματικού t-PA στηρίχθηκε στην αξιολόγηση της αμιδολυτικής ικανότητας του, με ειδική τεχνική υποστρώματος.

Για τον ακριβή φυσικοχημικό χαρακτηρισμό των λιποσωματικών μορφών t-PA έγιναν οι ακόλουθες μετρήσεις:

- Υπολογισμός ποσοστού εγκλωβισμού t-PA. Η συγκέντρωση της εγκλωβισμένης t-PA υπολογίστηκε βάση της αμιδολυτικής ικανότητας των λιποσωμάτων μετά από διάσπασή τους με απορρυπαντικό
- Το μέγεθος και το επιφανειακό φορτίο των λιποσωμάτων μετρήθηκε με σκέδαση laser σε ειδικό μετρητή σωματιδίων
- Για την ακριβή συγκέντρωση του λιπιδίου στα λιποσωματικά δείγματα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Stewart.

Η μείωση του μεγέθους των λιποσωμάτων (και η δημιουργία λιποσωμικών διασπορών με στενή κατανομή μεγέθους) που χρησιμοποιήθηκαν σε διάφορα πειράματα, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της εξώθησης μέσω μεμβρανών (membrane extrusion), από διάμετρο πόρου 400 nm μέχρι 100 nm και 50 nm σε κάποιες περιπτώσεις.

Η μέτρηση μεγέθους λιποσωμάτων έγινε με την τεχνική του PCS (Photon Correlation Spectroscopy) μετά από αραιώση μικρού δείγματος λιποσωμάτων σε τρις-απεσταγμένο νερό (3.5 mL).<sup>90</sup> (Παράρτημα 1, 2)



Εικόνα 20. Φωτογραφία από μονόστιβα λιποσώματα (κρυο – ηλεκτρονική μικροσκοπία). DSPC: Distearoyl-phosphatidyl-choline (saturated synthetic phospholipid)

### 1.2.6. Αξιολόγηση

Η αξιολόγηση της θρόμβωσης σε αντί κονίκλου αλλά και αμφιβληστροειδικού αγγείου έγινε πρώτα με οπτική αξιολόγηση – διαφανοσκόπηση για το πείραμα θρόμβωσης αυτιού, και με βυθοσκόπηση αλλά και φλουοραγγειογραφία στη θρόμβωση των αμφιβληστροειδικών αγγείων. Επίσης σε επιλεγμένες περιπτώσεις αυτό αξιολογήθηκε και ιστολογικά (η παρουσία θρόμβου στον αυλό του αγγείου). Οπτική τομογραφία συνοχής (OCT) χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση του πάχους του αμφιβληστροειδή σε επιλεγμένα πειραματόζωα.

Η παρουσία του tPA ενδοαγγειακά αξιολογήθηκε κυρίως με ανοσοϊστοχημεία. Προηγήθηκε θανάτωση του πειραματόζωου, και εξόρυξη του οφθαλμού (ή του ιστοτεμαχίου στην περίπτωση θρόμβωσης ωτιαίων αγγείων), και μονιμοποίηση σε φορμαλδεΰδη 10% σε TBS. Μετά δύο ημέρες ακολούθησε παρασκευή του τελικού ιστοτεμαχίου για ανοσοϊστοχημεία.

#### 1.2.6.1. Ιστολογία

Πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Οπτικής και Όρασης του Πανεπιστημίου Κρήτης, από την βιολόγο κα **Ειρήνη Ναουμίδα**.

Η τεχνική που ακολουθήθηκε για την παρασκευή δειγμάτων – ιστοτεμαχίων φωτονικής μικροσκοπίας ήταν η παρακάτω:

τα δείγματα μονιμοποιήθηκαν με 2,5% γλουταραλδεΰδης σε ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικού άλατος 0,1M (PH – 7,4). Μετά από 24 ώρες, προπαρασκευάστηκαν με τετροξείδιο του οσμίου σε ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικού άλατος σε θερμοκρασία 4 °C, αποξηράνθηκαν με τη χρήση μιας σειράς αλκοολών και προπυλενικού οξειδίου, και εμπεδώθηκαν με ρητίνη και σε paraplast. Εντομές πάχους 1-3mm των δειγμάτων παρασκευάστηκαν και χρώστησαν με 1% κυανού της τολουιδίνης, τρίχρωμη χρώση για να εξεταστούν με το οπτικό μικροσκόπιο. Οι περιοχές που επιλέχθηκαν για να εξεταστούν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, κόπηκαν σε λεπτές εντομές και χρώστησαν με άλας ουρανυλίου και κιτρικό μόλυβδο.

### 1.2.6.2. Ανοσοϊστοχημεία

Εδώ πρέπει να αναφερθεί ότι η ανοσοϊστοχημεία, πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με την συνεργάτιδά μας Dr.Sci.Biol **Grigoryan E.N.**, PhD.<sup>i</sup>

**Το αντίσωμα** που χρησιμοποιήθηκε για την αναγνώριση της παρουσίας t-PA στους ενδοφθάλμιους ιστούς ήταν ένα αντι – ανθρώπινο, αντι – tPA μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού<sup>ii</sup> που παράγεται από ανοσοποίηση ποντικών με κεκαθαρμένο ανθρώπινο ιστικό ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (tPA).

#### Μεθοδολογία ανοσοϊστοχημείας:

Αντίσωμα: περιγράφεται παραπάνω

#### A) Λήψη, προετοιμασία και κόψιμο ιστού

Όλα τα δείγματα ιστών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω για ανοσοϊστοχημικές μελέτες υπέστησαν την κατεργασία της κρυοπροστασίας και του τελικού παγώματος του ιστού.

Μετά την θανάτωση των ζώων, αφαιρέθηκαν οι οφθαλμοί και καθαρίστηκαν καλά εξωτερικά, από μύες και αγγεία. Όση ώρα χρειάστηκε συνολικά ώστε να αφαιρεθούν οι οφθαλμοί από όλα τα ζώα, τα υπόλοιπα διατηρούνταν μέσα σε τρυβλία Petri σε διάλυμα PBS 0,1M με pH 7,4. Στη συνέχεια κόπηκαν οι οφθαλμοί μέσω εργαλείων μικροχειρουργικής με σκοπό τη δημιουργία ιστοτεμαχίων. Η όλη διαδικασία έγινε με τρόπο τέτοιο ώστε τα ιστοτεμάχια να μην συμπεριλαμβάνουν την περιοχή του οπτικού νεύρου.

Τα ιστοτεμάχια τοποθετήθηκαν σε διάλυμα παραφορμαλδεΰδης 10% σε PBS 0,1M, το οποίο είχε προψυχθεί στους 4 °C, με σκοπό τη μονιμοποίηση τους. Μετά από 6 ώρες το ήδη υπάρχον διάλυμα ανανεώθηκε με φρέσκο διάλυμα παραφορμαλδεΰδης 4% σε PB 0,1M, στο οποίο και παρέμειναν οι ιστοί στους 4 °C για 16-18

<sup>i</sup> Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Vavilov str., 26, 119991 Moscow, Russia

<sup>ii</sup> tPA (Ab-1) Cat# GF53, της Oncogene Research Products



ώρες. Κατόπιν τα ιστοτεμάχια κατεργάστηκαν ώστε να κρυοπροστατευτούν. Τα δείγματα επώαστηκαν σε δύο αυξανόμενες συγκεντρώσεις σουκρόζης 5% και 20% σε διάλυμα PBS 0.1M. Στη συγκέντρωση 5% η επώαση επαναλήφθηκε τρεις φορές και κάθε φορά είχε διάρκεια 15 λεπτών. Στη συγκέντρωση 20% η επώαση διήρκησε 16-18 ώρες. Όλες οι διαδικασίες κρυοπροστασίας έγιναν στους 4 °C. Στη συνέχεια ακολούθησε το πάγωμα των ιστών, το οποίο έγινε ακαριαία, όντας περικλεισμένοι σε O.C.T compound μέσα σε υγρό άζωτο για 20 δευτερόλεπτα. Από τους παγωμένους ιστούς που φυλάσσονταν στους μείον 50 °C, ελήφθησαν με κρυοστάτη (Leica CM 1900) σε θερμοκρασία -18/-20 °C τομές πάχους 8 μικρομέτρων οι οποίες επιστρώθηκαν σε αντικειμενοφόρους (Super Frost Plus), προσέχοντας να είναι 6-8 τομές ανά πλάκα και οι τομές να είναι όλες κοντά στην κεφαλή του οπτικού νεύρου. Από κάθε δείγμα πάρθηκε τέτοιος αριθμός τομών ώστε σε ένα δείγμα να αντιστοιχούν πέντε αντικειμενοφόροι. Οι παγωμένες τομές διατηρήθηκαν μέχρι την επόμενη κατεργασία στους -20 °C .

Τα τμήματα του ιστού τα οποία δεν προχώρησαν σε κρυοπροστασία διατηρήθηκαν μέσα σε μονιμοποιητικό (παραφορμαλδεΰδη 4%) στους 4 °C .

#### B)Ανοσοϊστοχημεία (έμμεσης σήμανσης)

Αρχικά, οι πλάκες με τις τομές (από τους -20 °C) τοποθετήθηκαν σε ειδικό σκοτεινό θάλαμο για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 40 °C, ώστε να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου και να υγροποιηθούν, αφού αυτή είναι η κατάλληλη θερμοκρασία για κάθε πείραμα ανοσοϊστοχημείας. Κατόπιν οι τομές ξεπλύθηκαν τρεις φορές σε διάλυμα 0,1 M PBS pH 7,4. Το κάθε ξεπλυμα διαρκούσε δέκα λεπτά. Η μη ειδική πρόσδεση του πρωτοταγούς αντισώματος μπλοκαρίστηκε με την επώαση των τομών για τριάντα λεπτά σε BSA 0,1% σε PBS 0,1M στους 4 °C . Στη συνέχεια μετά από άλλα τρία διαδοχικά δεκάλεπτα ξεπλύματα σε διάλυμα 0,1 M PBS pH 7,4, οι τομές επώαστηκαν με το πρωτοταγές μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο είναι αντι – tPA μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού. Η επώαση είχε διάρκεια 16-18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η αραίωση του αντισώματος με την οποία έγινε το πείραμα ήταν 1:100 μέσα σε διάλυμα PBS 0,1 M το οποίο περιέχει απορρυπαντικό (Triton-X-100: ανοίγει οπές στην πλασματική μεμβράνη ώστε να εισχωρήσει το αντίσωμα) 0,3% και BSA 0,5%. Λόγω του ότι δεν υπήρχαν οδηγίες από την παρασκευάστρια εταιρία για την ακριβή διάλυση στην οποία έπρεπε να χρησιμοποιηθεί το αντίσωμα επιλέχθηκε η

διάλυση 1:100, αντί 1:50 και 1:250, σύμφωνα με τα κριτήρια της ειδικότητας και της ευαισθησίας του αντισώματος.

Την επόμενη μέρα, οι τομές δέχονταν τρία δεκάλεπτα ξεπλύματα με διάλυμα PBS 0,1M pH 7,4 και επωάζονταν για 3 ώρες με το φθορίζον δευτερογενές αντίσωμα FITC-συζευγμένο αντίσωμα αντί- ποντικού, προέλευσης γίδας (IgG-ολικό μόριο, Sigma). Η αραιώση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1:20 και 1:50 μέσα σε PBS 0,1M (οι οδηγίες από την παρασκευάστρια εταιρία ήταν η διάλυση 1:32)

Ακολουθούσαν τρία τελευταία δεκάλεπτα ξεπλύματα με διάλυμα PBS 0,1M pH7.4, ενώ οι τομές καλύπτονταν με ειδικό υγρό μέσο κάλυψης, (mounting medium) και καλυπτρίδα.

Όλες οι τομές αναλύθηκαν και φωτογραφήθηκαν σε μικροσκόπιο Olympus AH-3 (ocular 10x, objective 20x και λογισμικό Studio Life, Viewfinder Lite).

Όλες οι τομές που πάρθηκαν από τους οφθαλμούς – μάρτυρες, χειρίστηκαν ακριβώς με τον ίδιο τρόπο, με τη διαφορά πως δέχτηκαν επώαση αποκλειστικά με το δευτερογενές φθορίζον αντίσωμα ώστε να ελεγχθεί και ο βαθμός της ειδικής πρόσδεσης του πρωτογενούς αντισώματος.

### **1.2.7. Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF)** (Vascular Endothelial Growth Factor)

Σε σειρά πειραμάτων κονίκλων χρησιμοποιήθηκε-ενέθηκε ο ανασυνδυασμένος ανθρώπινος αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF 165),<sup>i</sup> για την τροποποίηση του αιματοαμφιβληστροειδικού φραγμού.<sup>7,8,9</sup>

<sup>i</sup> Recombinant Human VEGF 165, Catalog Number: 293-VE, R&D Systems

## **2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

## **2.1. ΚΑΙΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

Ο σχεδιασμός της μελέτης ήταν για μια προοπτική σειρά ασθενών. Πραγματοποιήθηκε στην Οφθαλμολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, μετά από έγκριση του Επιστημονικού Συμβουλίου του Νοσοκομείου. Η έναρξή της πραγματοποιήθηκε το Μάιο του 2002 (εισαγωγή του πρώτου ασθενούς στην μελέτη).

### ***2.1.1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΘΡΟΜΒΩΣΗ ΚΑΛΙΟΥ ΦΛΕΒΑΣ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ***

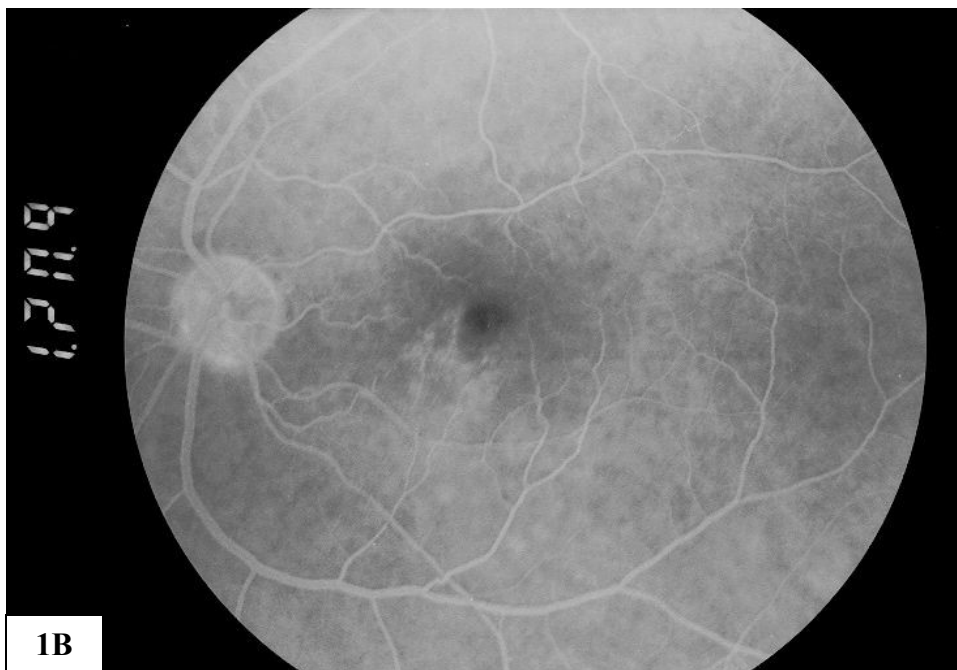
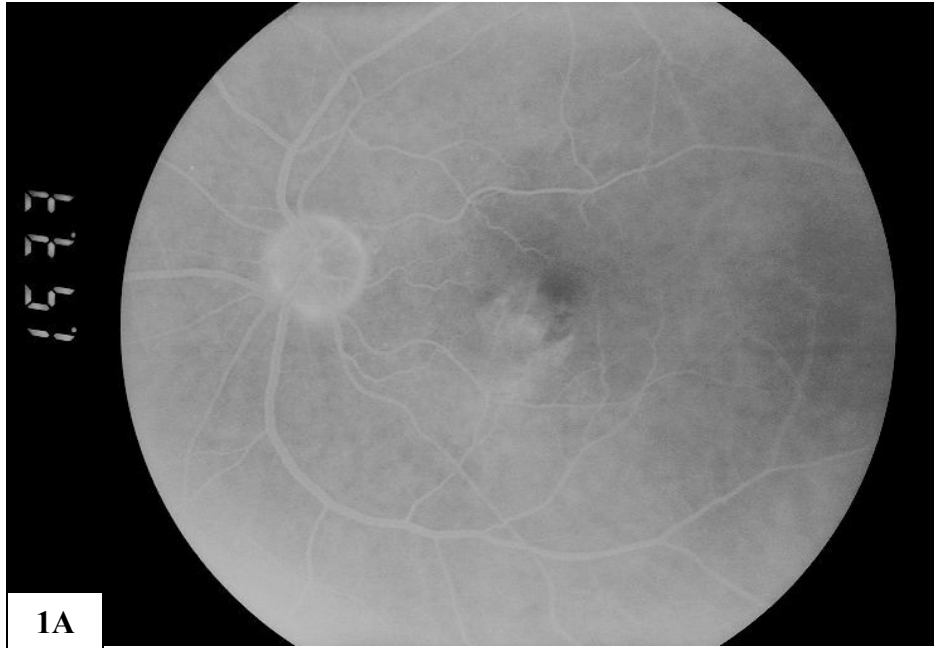
Εισήχθησαν τρεις ασθενείς στη μελέτη και η πορεία τους παρουσιάζεται παρακάτω.

#### **ΑΣΘΕΝΗΣ 1**

Γυναίκα 67 ετών προσήλθε το Μάιο του 2002 στο Οφθαλμολογικό Εξωτερικό Ιατρείο, παραπονούμενη για θάμβος όρασης αριστερού οφθαλμού από 20ημέρου. Η αντικειμενική εξέταση έδειξε οπτική οξύτητα 0,3 (Snellen) και ο αριστερός οφθαλμός (ΑΟ) έπασχε από θρόμβωση κάτω κλάδου φλέβας αμφιβληστροειδούς. Η φλουοροαγγειογραφία έδειξε διαρροή χρωστικής που επηρέαζε την κεντρική περιοχή (Εικόνα 1Α). Η ασθενής υποβλήθηκε στην επέμβαση της μελέτης την ίδια μέρα, και δεν παρατηρήθηκαν διεγχειρητικές ή πρώιμες μετεγχειρητικές επιπλοκές.

Υπήρξε γρήγορη απορρόφηση των ενδοαμφιβληστροειδικών αιμορραγιών και του οιδήματος κατά την πρώτη μετεγχειρητική περίοδο (πρώτος μήνας), αλλά στη φλουοροαγγειογραφία δεν υπήρξαν ενδείξεις αποκατάστασης της κυκλοφορίας του θρομβωμένου αγγείου (Εικόνα 1Β). Η ασθενής ανέπτυξε μια ήπια επιαμφιβληστροειδική μεμβράνη 10 μήνες μετεγχειρητικά, η οποία δεν έδειξε σημάδια εξέλιξης μέχρι

την τελευταία επίσκεψη (Εικόνα 1Γ). Η αρχική της όραση από 0,3 βελτιώθηκε σε 0,4 (Snellen) στο τέλος της περιόδου παρακολούθησης, 42 μήνες μετεγχειρητικά.





Εικόνα 1. Ο ασθενής 1 με κλαδική θρόμβωση ΑΟ (κλάδος της κάτω κροταφικής φλέβας). (Α) προεγχειρητική φλουοροαγγειογραφία, χρόνος 1 min 53 sec: διαρροή χρωστικής στην κεντρική περιοχή. (Β) 28<sup>η</sup> μετεγχειρητική ημέρα: βελτίωση της διαρροής στην αγγειογραφία. (Γ) 11<sup>ος</sup> μετεγχειρητικός μήνας: επιαμφιβληστροειδική μεμβράνη· διακρίνεται ελίκωση αγγείων στην κεντρική περιοχή (πρώιμες φάσεις αγγειογραφίας)

## ΑΣΘΕΝΗΣ 2

Τον Ιούνιο του 2002, προσήλθε μια 68χρονη γυναίκα, παραπονούμενη για θάμβος όρασης δεξιού οφθαλμού από 21 ημέρες. Κατά την εξέταση η οπτική οξύτητα ήταν μέτρηση δακτύλων στο 1,5 μέτρο και η διάγνωση ήταν θρόμβωση κλάδου της άνω κροταφικής φλέβας, που περιελάμβανε την κεντρική περιοχή. Η ασθενής υποβλήθηκε την επόμενη ημέρα στην επέμβαση της μελέτης χωρίς επιπλοκές. Είχε χρόνο παρακολούθησης 4 μήνες, και δεν προσήλθε στις υπόλοιπες προγραμματισμένες εξετάσεις. Κατά την τελευταία επίσκεψη είχε οπτική οξύτητα μέτρηση δακτύλων στα 2 μέτρα (Πίνακας 4), και η φλουοροαγγειογραφία δεν έδειξε βελτίωση στη θρομβωμένη περιοχή.

Πίνακας 4: Στοιχεία ασθενών με κλαδική θρόμβωση φλέβας

Ασθενής/φύλο	1Θ	2Θ	3Α
Ηλικία (έτη)	67	68	76
Οφθαλμός	ΑΟ	ΔΟ	ΑΟ
BCVA	0,3	ΜΔ 1,5 m	0,3
Χρόνος(ημέρες)	20	21	14
F/UP (μήνες)	42	4	13
BCVA (τελική)	0,4	ΜΔ 2 m	0,2
Επιπλοκές	ERM		VH
Επανεπέμβαση	όχι	όχι	υαλοειδεκτομή

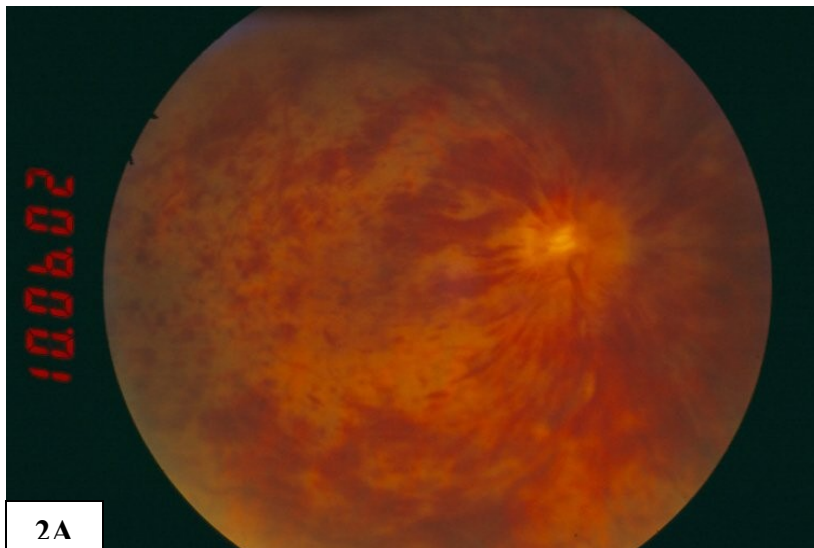
Θ: θήλυ, Α: άρρεν, Χρόνος (ημέρες) αναφέρεται στην διάρκεια των συμπτωμάτων πριν το χειρουργείο, BCVA: βέλτιστη οπτική οξύτητα με διόρθωση (best corrective visual acuity), F/UP: χρόνος παρακολούθησης, ERM: επιαμφιβληστροειδική μεμβράνη (epiretinal membrane), VH: υαλοειδική αιμορραγία (vitreous hemorrhage).

### ΑΣΘΕΝΗΣ 3

Τον Αύγουστο του 2002 προσήλθε 76χρονος άνδρας με θάμβος όρασης αριστερού οφθαλμού από 14ημέρου. Η οπτική του οξύτητα ήταν 0,3 (Snellen) και τέθηκε διάγνωση θρόμβωση κλάδου της κάτω κροταφικής φλέβας. Ο ασθενής χειρουργήθηκε την ίδια ημέρα και δεν υπήρξαν διεγχειρητικές επιπλοκές. Τις επόμενες μετεγχειρητικές ημέρες εμφάνισε ενδοϋαλοειδική αιμορραγία που χρειάστηκε πρόσθετη επέμβαση υαλοειδεκτομής για να αποκατασταθεί. Η τελική βιομικροσκοπική και φλουοραγγειογραφική εικόνα (13 μήνες μετεγχειρητικά) δεν έδειξε σημεία αποκατάστασης της ροής στην πορεία του θρομβωμένου αγγείου, ενώ είχε αναπτυχθεί αναστομωτικό δίκτυο (collateral vessels) στα όρια της θρομβωμένης περιοχής. Η οπτική οξύτητα στην τελευταία εξέταση (13<sup>ος</sup> μήνας) είχε μειωθεί από 0,3 σε 0,2 (Snellen).

**2.1.2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΘΡΟΜΒΩΣΗ ΚΕΝΤΡΙΚΗΣ ΦΛΕΒΑΣ****ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΗ**ΑΣΘΕΝΗΣ 4

74χρονος άνδρας προσήλθε τον Ιούνιο του 2002 με θάμβος όρασης στο δεξιό οφθαλμό από 25 ημέρες. Η οπτική οξύτητα ήταν μέτρηση δακτύλων στα 3 μέτρα και ο δεξιός οφθαλμός έπασχε από μη – ισχαιμική μορφή θρόμβωσης κεντρικής φλέβας του αμφιβληστροειδή. Ο ασθενής χειρουργήθηκε την ίδια ημέρα, και δεν υπήρξαν διεγχειρητικές ή πρώιμες μετεγχειρητικές επιπλοκές. Υπήρξε γρήγορη απορρόφηση των αιμορραγιών κατά τη διάρκεια του πρώτου μετεγχειρητικού μήνα, ενώ η φλουροαγγειογραφία δεν έδειξε σημεία αποκατάστασης της ροής. Ο ασθενής, 18 μήνες αργότερα, ανέπτυξε διαταραχές χρωστικής στην περιοχή της ωχράς (Εικόνα 2). διατήρησε όραση για 38 μήνες σε επίπεδο μέτρησης δακτύλων στα 3 μέτρα, ενώ υποβλήθηκε σε ανεπίπλεκτη επέμβαση καταρράκτη τον 34<sup>ο</sup> μήνα (Πίνακας 5).







Εικόνα 2. Ασθενής 4 με θρόμβωση κεντρικής φλέβας αμφιβληστροειδή Δε Οφθαλμού. Α) προεγχειρητική φωτογραφία βυθού. Β) μετεγχειρητική φωτογραφία βυθού (1 μήνα μετεγχειρητικά): απορρόφηση των αιμορραγιών. Γ) 18 μήνες μετεγχειρητικά: διαταραχές χρωστικής στην κεντρική περιοχή

#### ΑΣΘΕΝΗΣ 5

Τον Ιούνιο του 2002, εμφανίστηκε στο Οφθαλμολογικό ιατρείο ένας 80χρονος άνδρας με θάμβος όρασης δεξιού οφθαλμού από 12ημέρου. Η αντικειμενική εξέταση έδειξε οπτική οξύτητα μέτρησης δακτύλων στα 0,5 μέτρα στον πάσχοντα οφθαλμό. Ο

ασθενής είχε κόρη Marcus Gunn σύστοιχα (σχετικό έλλειμμα κεντρομόλου αντανakλαστικού κόρης – relative afferent papillary defect) (ένδειξη αμφιβληστροειδικής ισχαιμίας) και θρόμβωση κεντρικής αμφιβληστροειδικής φλέβας με πολλαπλές αιμορραγίες σε 4 τεταρτημόρια του αμφιβληστροειδή, αν και η προεγχειρητική φλουοροαγγειογραφία δεν έδειξε αμφιβληστροειδική ισχαιμία. Ο ασθενής υποβλήθηκε στην επέμβαση της μελέτης την ίδια ημέρα και δεν υπήρξαν διεγχειρητικές επιπλοκές. Την δεύτερη μετεγχειρητική ημέρα ανέπτυξε ήπια ενδοϋαλοειδική αιμορραγία, που απορροφήθηκε αυτόματα κατά τη διάρκεια του πρώτου μετεγχειρητικού μήνα. Ο ασθενής δεν έδειξε σημεία νεοαγγείωσης του προσθίου ημιμορίου κατά τη διάρκεια περιόδου παρακολούθησης 37 μηνών. Επιπρόσθετα, η οπτική οξύτητά του μειώθηκε κι άλλο την περίοδο παρακολούθησης από μέτρηση δακτύλων σε αντίληψη φωτός (ΑΦ), και η φλουοροαγγειογραφία δεν έδειξε βελτίωση της κυκλοφορίας των αμφιβληστροειδικών αγγείων.

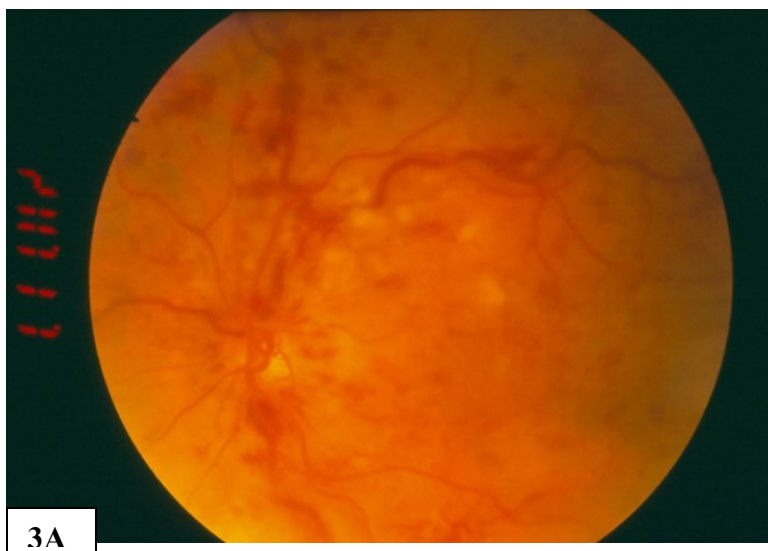
Πίνακας 5. Στοιχεία ασθενών με θρόμβωση κεντρικής φλέβας

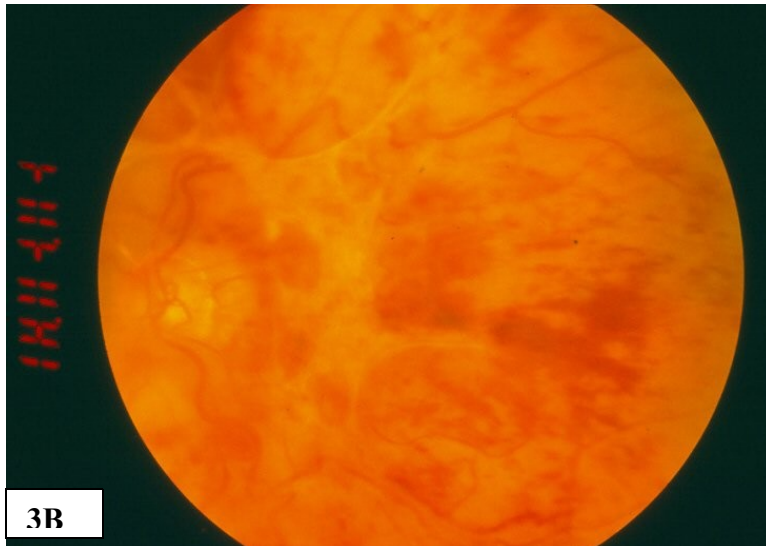
<b>Ασθενής/φύλο</b>	4Α	5Α	6Α
<b>Ηλικία (έτη)</b>	74	80	73
<b>Οφθαλμός</b>	ΔΟ	ΔΟ	ΑΟ
<b>BCVA</b>	ΜΔ 3m	ΜΔ 0,5 m	ΜΔ 1 m
<b>Χρόνος(ημέρες)</b>	25	12	11
<b>F/UP (μήνες)</b>	38	37	41
<b>BCVA (τελική)</b>	ΜΔ 3 m	ΑΦ	ΑΦ
<b>Ισχαιμική</b>	Όχι	Ναι	Ναι
<b>Επιπλοκές</b>		VH	Προαμφ/κή ίνωση
<b>Επανεπέμβαση</b>	καταρράκτης	όχι	Υαλοειδεκτομή κυκλοκροπηξία

A: άρρεν, BCVA: βέλτιστη οπτική οξύτητα με διόρθωση (best corrective visual acuity), ΜΔ: μέτρηση δακτύλων, Χρόνος (ημέρες): διάρκεια των συμπτωμάτων πριν το χειρουργείο, ΑΦ: αντίληψη φωτός, F/UP: χρόνος παρακολούθησης, VH: υαλοειδική αιμορραγία (vitreous hemorrhage).

ΑΣΘΕΝΗΣ 6

Τον Νοέμβρη του 2002 προσήλθε 73χρονος άνδρας με θάμβος όρασης αριστερού οφθαλμού από 10ημέρου. Είχε οπτική οξύτητα μέτρησης δακτύλων στο 1 μέτρο και τέθηκε διάγνωση θρόμβωση κεντρικής φλέβας Αρ Οφθαλμού· είχε κόρη Marcus Gunn με πολλαπλές αιμορραγίες στα 4 τεταρτημόρια και επίσης η προεγχειρητική φλουοροαγγειογραφία δεν έδειξε αμφιβληστροειδική ισχαιμία. Ο ασθενής χειρουργήθηκε την επόμενη της προσέλευσης μέρα, ενώ δεν υπήρξαν διεγχειρητικές επιπλοκές· 4 μήνες αργότερα ανέπτυξε σοβαρή προαμφιβληστροειδική ίνωση στον οπίσθιο πόλο για την οποία υποβλήθηκε σε συνδυασμένη επέμβαση καταρράκτη υαλοειδεκτομής (Εικόνα 3). Στη συνέχεια, 12 μήνες μετεγχειρητικά, ανέπτυξε νεοαγγείωση οπτικού δίσκου και προσθίου ημιμορίου, και υποβλήθηκε αρχικά σε παναμφιβληστροειδική φωτοπηξία και στη συνέχεια σε περιφερική αμφιβληστροειδική κρυοπηξία. Τελικά ανέπτυξε νεοαγγειακό γλαύκωμα για το οποίο απαιτήθηκε κυκλοκροκαταστροφή προκειμένου να ελεγχθεί. Η όρασή του μειώθηκε από μέτρηση δακτύλων στο 1 μέτρο σε αντίληψη φωτός στο τέλος της περιόδου παρακολούθησης, σε 41 μήνες.





Εικόνα 3. Ασθενής 6 με θρόμβωση κεντρικής φλέβας αμφιβληστροειδούς αριστερού οφθαλμού (ΑΟ). Α) προεγχειρητική φωτογραφία. Β) 4<sup>ος</sup> μετεγχειρητικός μήνας: σοβαρή προαμφιβληστροειδική ίνωση στον οπίσθιο πόλο

Σ' αυτή τη φάση σταμάτησε η είσοδος ασθενών στη μελέτη, γιατί είχαμε ισχυρή ένδειξη από τα προκαταρκτικά αποτελέσματα των πρώτων 6 ασθενών, ότι δεν βελτιώνεται η φυσική πορεία της νόσου.

### 2.1.3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Είναι γνωστό πως η απόφραξη της φλέβας του αμφιβληστροειδή έχει συχνά κακή πρόγνωση, ενώ δεν υπάρχει ευρέως αποδεκτή θεραπεία προς το παρόν, που να οδηγεί σε αποκατάσταση της οπτικής λειτουργίας αλλά και της ροής στην περιοχή της θρόμβωσης.<sup>1, 13, 15, 19</sup> Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, λύση του θρόμβου και επανα-αγγείωση μπορεί να προκαλέσει μόνο η θρομβόλυση. Τα τελευταία έτη σειρά ερευνητών έδειξαν αυξημένο ενδιαφέρον για το πιθανό θεραπευτικό ρόλο των θρομβολυτικών παραγόντων και ειδικότερα του ανασυνδυσμένου ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (rt-PA). Το rt-PA έχει χορηγηθεί συστηματικά με ενδοφλέβια ένεση,<sup>39</sup> τοπικά με ενδοϋαλοειδική ένεση,<sup>40 41, 91, 92</sup> ενδοϋαλοειδικά μετά τομή του κοινού ελύτρου,<sup>50</sup> εντός του αυλού κλάδου αμφιβληστροειδικής φλέβας<sup>42</sup> και σε υποαμφιβληστροειδική ένεση.<sup>93</sup>

Λαμβάνοντας υπόψη τα ελπιδοφόρα αλλά όχι ικανοποιητικά αποτελέσματα των ενδοϋαλοειδικών ενέσεων ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου από τη μια, και τα ικανοποιητικά αποτελέσματα της συστηματικής του χορήγησης αλλά με βαριές επιπλοκές από την άλλη, στραφήκαμε σε προσπάθεια βελτίωσης της εφαρμογής θρομβολυτικού παράγοντα.

Συγκεκριμένα, με την τεχνική που εφαρμόσαμε, προσπαθήσαμε να αυξήσουμε τη διαθεσιμότητα του φαρμάκου (rt-PA) πάνω από την περιοχή του θρομβωμένου αγγείου, ενιόντάς το μετά υαλοειδεκτομή, σε περιβάλλον αέρα, ευελπιστώντας ότι θα αυξήσουμε την απορρόφησή του και κατά συνέπεια τη θρομβολυτική του δράση – αποτελεσματικότητα.<sup>94</sup>

Πολλοί ερευνητές προσπάθησαν να αξιολογήσουν την αποτελεσματικότητα της ενδοϋαλοειδικής έγχυσης rt-PA σε ασθενείς με θρόμβωση κλάδου φλέβας αμφιβληστροειδή. Οι Murakami et al<sup>91</sup> μελέτησαν το ρόλο της ενδοϋαλοειδικής έγχυσης rt-PA και έδειξαν όφελος στην υποχώρηση του οιδήματος της ωχράς· οι Garcia-Arumi et al<sup>50</sup> έδειξαν ανατομική και λειτουργική βελτίωση (οπτική οξύτητα)

σε ασθενείς με κλαδική θρόμβωση μετά χειρουργική αποσυμπίεση της πιεζόμενης φλέβας και ένεση ανασυνδυσμένου t-PA. Η Glacet-Bernard et al<sup>92</sup> χρησιμοποίησαν ενδοϋαλοειδικό t-PA σε ανθρώπους με θρόμβωση κεντρικής φλέβας πρόσφατης έναρξης και ανέφεραν ότι είναι ασφαλής τεχνική αλλά δεν τροποποιεί σημαντικά την φυσική πορεία της νόσου· οι Ghazi et al<sup>41</sup> ανέφεραν οπτική βελτίωση σε όλους τους ασθενείς με πρόσφατης έναρξης κεντρική θρόμβωση μη-ισχαιμικού τύπου, μετά θεραπεία με 50 μg ενδοϋαλοειδικό rt-PA, αλλά αμετάβλητη εικόνα στους ασθενείς με ισχαιμική μορφή.

Έχει αναφερθεί ότι σειρά παραγόντων εμποδίζουν την είσοδο του t-PA στα θρομβωμένα αγγεία μετά ενδοϋαλοειδική ένεση, περιλαμβάνοντας την εγκόλπωση του φαρμάκου σε υαλοειδικούς χώρους.<sup>68</sup> **Η κλινική μελέτη αυτή διαφέρει από προηγούμενες μελέτες με ενδοϋαλοειδική ένεση t-PA σε ένα μείζον σημείο: επιλέξαμε να ενέσουμε το t-PA μετά από υαλοειδεκτομή και ανταλλαγή υγρού – αέρα.** Αυτό επέτρεψε την εμφύσηση της περιοχής του θρομβωμένου αγγείου σε διάλυμα με μέγιστη συγκέντρωση t-PA, **ενισχύοντας τη δυνατότητα απορρόφησης του φαρμάκου στο αμφιβληστροειδικό αγγειακό δίκτυο·** ακόμα περισσότερο αποφύγαμε χειρισμούς πάνω στην αμφιβληστροειδική επιφάνεια αυξάνοντας έτσι την ασφάλεια και την απλότητα της μεθόδου.

**Η παρούσα μελέτη (case series) δεν μπόρεσε να αναδείξει βελτίωση στην οπτική οξύτητα (main outcome measure) σε καμία από τις 6 περιπτώσεις θρόμβωσης που αξιολόγησε (3 ασθενείς με κλαδική και 3 ασθενείς με κεντρική θρόμβωση φλέβας αμφιβληστροειδή)·** οι ασθενείς με κλαδική θρόμβωση διατήρησαν οπτική οξύτητα στα επίπεδα της αρχικής εξέτασης, ενώ οι ασθενείς με ισχαιμική μορφή θρόμβωσης κεντρικής φλέβας (ασθενείς 5 και 6) στο τέλος της περιόδου παρακολούθησης είχαν πολύ χαμηλή όραση (αντίληψη φωτός). Η ροή των αμφιβληστροειδικών αγγείων, σύμφωνα με την φλουοραγγειογραφική εικόνα, παρέμεινε αμετάβλητη σε όλους τους ασθενείς, που έδειξαν να ακολουθούν τη φυσική πορεία της νόσου τους.

Παρά τους περιορισμούς της παρούσας μελέτης (μικρός αριθμός ασθενών, απουσία ομάδας ελέγχου), η αδυναμία της τεχνικής μας να βελτιώσει την πρόγνωση στην όραση των ασθενών, αλλά και την κατάσταση της ροής των αγγείων του αμφιβληστροειδή, δημιουργεί προβληματισμούς για την αποτελεσματικότητα των ενδοϋαλοειδικών ενέσεων t-PA για την απόφραξη της αμφιβληστροειδικής φλέβας. Η αποτυχία αυτή μπορεί να οφείλεται στην απενεργοποίηση του rt-PA στην υαλοειδική

κοιλότητα,<sup>69</sup> στην αδυναμία του rt-PA να διαπερνά τους ιστούς και να φθάνει ενδοαυλικά στο θρομβωμένο αγγείο ή την αδυναμία του φαρμάκου να λύσει το θρόμβο ορισμένο χρονικό διάστημα μετά τη δημιουργία του. Η **ικανότητα του rt-PA να διαπερνά την έσω αφοριστική μεμβράνη (ILM)** είναι αμφιλεγόμενη: οι Mahmoud et al<sup>70</sup> έδειξαν ότι μετά ενδοϋαλοειδική ένεση του t-PA στην υαλοειδική κοιλότητα μπορεί να διαπεράσει το αγγειακό τοίχωμα αμφιβληστροειδικών αγγείων σε χείρειους οφθαλμούς. Αντίθετα οι Kamei et al<sup>95</sup> παρατήρησαν (σε οφθαλμούς κονίκλων) ότι το t-PA δε μπορεί να διαχυθεί στον υπαμφιβληστροειδικό χώρο μετά ενδοϋαλοειδική ένεση. Οι Garcia-Arumi et al<sup>50</sup> πραγματοποίησαν τομή του κοινού ελύτρου αρτηρίας – φλέβας πριν την ανταλλαγή υγρού αέρα και την ένεση t-PA, που σε συνδυασμό με την αποσυμπίεση, τροποποιεί την έσω αφοριστική μεμβράνη και τους φραγμούς της αιματοαμφιβληστροειδικής κυκλοφορίας· επομένως, η αναφερόμενη επιτυχία που περιγράφει ο ερευνητής μπορεί να οφείλεται σε συνδυασμό της ένεσης t-PA με τους μηχανικούς χειρισμούς που ενίσχυσαν την πρόσβαση του φαρμάκου στον ενδοαγγειακό χώρο.

**Η ηλικία του θρόμβου** πιθανά αποτελεί επιπλέον περιοριστικό παράγοντα· υπάρχει πληροφορία στη βιβλιογραφία πως μόνο θρόμβοι πρόσφατης δημιουργίας (μικρότερης των 8 ημερών) μπορούν να λύνονται.<sup>96</sup> Η ηλικία των θρόμβων στους ασθενείς της μελέτης ήταν 17,2 ημέρες (από 11 – 25 ημέρες), χρόνος που μπορεί να θεωρηθεί σχετικά μικρός σε σχέση με τη βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα οι Weiss και Bynoe<sup>42</sup> έδειξαν βελτίωση μετά υαλοειδεκτομή και καθετηριασμό με t-PA αμφ/κών αγγείων σε 28 ασθενείς με μέση ηλικία θρόμβωσης κεντρικής φλέβας 4,9 μήνες (από 0,25 μέχρι 30 μήνες), ενώ οι Garcia-Arumi et al<sup>50</sup> ανέφεραν βελτίωση σε ασθενείς με κλαδική θρόμβωση φλέβας με μέση διάρκεια θρόμβωσης 13 εβδομάδες και οι Lam και Blumenkranz ανέφεραν βελτίωση ενός ασθενούς με θρόμβωση κεντρικής φλέβας ηλικίας 4 μηνών.<sup>93</sup> Επιπλέον λόγος αποτυχίας μπορεί να είναι ότι στην παθογένεια της θρόμβωσης αναφέρεται η **σκλήρυνση** της παρακείμενης ή διασταυρούμενης αρτηρίας: ακόμα κι αν το t-PA διαπεράσει το φλεβικό τοίχωμα, πιθανά ο μηχανισμός της θρομβόλυσης να μην είναι αρκετός για τη λύση του θρόμβου.

Η χειρουργική τεχνική καθ' αυτή σε όλες τις περιπτώσεις ήταν ανεπίπλεκτη. Η αρχικά υψηλή συγκέντρωση του rt-PA σε οφθαλμούς με αέρα, δημιουργεί όμως προβληματισμούς για την **ασφάλεια της μεθόδου**: αν και κανένας ασθενής δεν ανέπτυξε σοβαρές επιπλοκές άμεσα συσχετισμένες με την επέμβαση, μερικά ευρήματα στην παρακολούθηση των ασθενών μπορεί να οφείλονται στο rt-PA. Ο

ασθενής 3 με κλαδική θρόμβωση (BVO) ανέπτυξε **ενδοϋαλοειδική αιμορραγία** την πρώιμη μετεγχειρητική περίοδο που απαιτήθηκε υαλοειδεκτομή, ενώ ο ασθενής 5 με κεντρική θρόμβωση (CVO) ανέπτυξε ηπιότερη αιμορραγία, η οποία απορροφήθηκε αυτόματα κατά την διάρκεια του πρώτου μήνα. Οι πρώιμες μετεγχειρητικές αιμορραγίες μπορεί να οφείλονται στη θρομβολυτική δράση του rt-PA: οι Hassan et al<sup>97</sup> σε σειρά 15 ασθενών που χορηγήθηκε ενδοϋαλοειδικά rt-PA με αέριο για μετατόπιση υποωχρικής αιμορραγίας, ανέφεραν 3 περιπτώσεις ενδοϋαλοειδικής αιμορραγίας, οι δύο από τις οποίες υποβλήθηκαν σε υαλοειδεκτομή. Η ασθενής 1 (BVO) ανέπτυξε ήπια **επιαμφιβληστροειδική μεμβράνη** που δεν απαιτήσε επέμβαση, ενώ ο ασθενής 6 (CVO) εκδήλωσε σοβαρή προαμφιβληστροειδική ίνωση που χρειάστηκε υαλοειδεκτομή. Η ανάπτυξη επιαμφιβληστροειδικών μεμβρανών πιθανόν να σχετίζεται με την ένεση rt-PA.<sup>98</sup> Τέλος, οι **διαταραχές χρωστικής** στην κεντρική περιοχή του ασθενούς 4 (CVO), αν και θα μπορούσαν να αποδοθούν στο χρόνιο κυστοειδές οίδημα, μπορεί να σχετίζονται με τη χορήγηση rt-PA: οι Chen et al<sup>99</sup> ανέφεραν διάχυτες διαταραχές χρωστικής μετά ενδοϋαλοειδική ένεση 50 μg rtPA για υποωχρική αιμορραγία.

Συνοψίζοντας, για αυτή τη σειρά ασθενών, η κλινική μελέτη δεν μπόρεσε να αναδείξει όφελος στους ασθενείς με πρόσφατη απόφραξη αμφιβληστροειδικής φλέβας (κεντρικής ή κλαδικής),<sup>100</sup> που υποβλήθηκαν σε υαλοειδεκτομή, ανταλλαγή υγρού – αέρα και ένεση 50 μg tPA στην υαλοειδική κοιλότητα. Ακόμη περισσότερο δημιούργησε ερωτήματα, όπως:

1. Το tPA μπορεί να περάσει τον αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό, ενιέμενο ενδοϋαλοειδικά, και να αποκτήσει πρόσβαση στον αυλό του θρομβωμένου αγγείου;
2. Μήπως ένας από τους λόγους που η παρούσα θεραπευτική πρόταση δεν έδειξε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, είναι η γρήγορη απενεργοποίηση του tPA στην υαλοειδική κοιλότητα, και πρέπει να αναζητήσουμε συστήματα παρατεταμένης αποδέσμευσης του φαρμάκου;

Επομένως, η πειραματική σειρά είχε σκοπό, εκτός από το να αξιολογήσει τη δράση του tPA σε μοντέλο θρόμβωσης, μετά από εξωαγγειακή χορήγηση, και να



διερευνήσει την ικανότητα του φαρμάκου να διαπερνά τον αιματο-  
αμφιβληστροειδικό φραγμό και να αποκτήσει πρόσβαση στον αυλό του αγγείου.

## **2.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **Στο πειραματικό μέρος, στόχος ήταν:**

1. να αναπτύξουμε πειραματικό μοντέλο φωτοδυναμικής θρόμβωσης επιπολής ωτιαίων αγγείων κουνελιού, να επιβεβαιώσουμε ιστολογικά την ύπαρξη του θρόμβου, να ελέγξουμε με ανοσοϊστοχημεία την ικανότητα του tPA και του tPA σε λιποσώματα, αν ενεθούν εξωαγγειακά (υποδόρια), να αποκτήσουν πρόσβαση στον αυλό του αγγείου,
2. να αναπτύξουμε πειραματικό μοντέλο φωτοδυναμικής θρόμβωσης αμφιβληστροειδών αγγείων κουνελιού, να αξιολογήσουμε τη φυσική πορεία της θρόμβωσης και να επιβεβαιώσουμε ιστολογικά την ύπαρξη του θρόμβου,
3. να αξιολογήσουμε σε σειρά πειραματόζωων (κονίκλων) την ικανότητα του ενδοϋαλοειδικού tPA να βελτιώνει τη φυσική πορεία της νόσου,
4. να αναπτύξουμε (σε συνεργασία με το τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου της Πάτρας) τροποποιημένο tPA, εγκλωβισμένο σε λιποσώματα, και να αξιολογήσουμε την ενδοϋαλοειδική του εφαρμογή στο περιγραφέν μοντέλο (αποτελεσματικότητα – ασφάλεια)
5. να αξιολογήσουμε με ανοσοϊστοχημεία την ικανότητα του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (με και χωρίς λιποσώματα), αν ενεθεί ενδοϋαλοειδικά (εξωαγγειακά), να αποκτήσει πρόσβαση στον αυλό των αμφιβληστροειδικών αγγείων
6. να αξιολογήσουμε με ανοσοϊστοχημεία την ικανότητα του tPA να διαπερνά και να αναγνωρίζεται ενδοαγγειακά σε αμφιβληστροειδικά αγγεία, μετά από ενδοϋαλοειδική ένεση σε οφθαλμούς, όταν έχει προηγηθεί ενδοϋαλοειδική ένεση VEGF (για αύξηση αγγειακής διαπερατότητας - διαταραχή αιματο – αμφιβληστροειδικού φραγμού)

### 2.2.1. ΠΕΙΡΑΜΑ 1

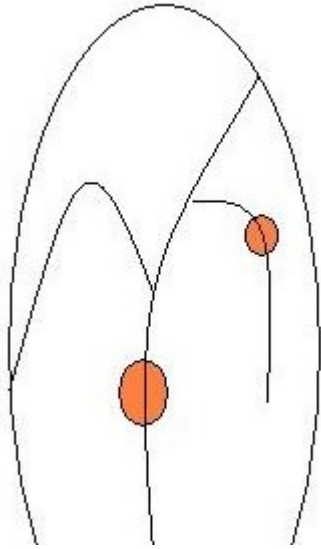
Ανάπτυξη πειραματικού μοντέλου φωτοδυναμικής θρόμβωσης επιπολής ωτιαίων αγγείων κουνελιού, ιστολογική επιβεβαίωση του θρόμβου, έλεγχος (ιστολογία) διαφόρων δόσεων tPA υποδόρια, και έλεγχος με ανοσοϊστοχημεία της ικανότητας του tPA σε λιπώματα, αν ενθεθεί εξωαγγειακά (υποδόρια), να αποκτήσει πρόσβαση στον αυλό του αγγείου.

#### 2.2.1.1. Φωτοδυναμική θρόμβωση ωτιαίων αγγείων κουνελιού, με χρήση visudyne

*Σκοπός:* Η ανάπτυξη πειραματικού μοντέλου φωτοδυναμικής θρόμβωσης επιπολής ωτιαίων αγγείων κουνελιού.

*Υλικό – Μέθοδος:* Στο πείραμα συμπεριλήφθησαν 4 κουνέλια, βάρους από 2950 – 3100 gr. Υπεβλήθησαν σε υποδόρια αναισθησία (§1.2.1.1. Αναισθησία – Θανάτωση) με συνδυασμό υδροχλωρικής κεταμίνης 20 – 25 mg/kg ΒΣ και υδροχλωρικής ξυλαζίνης σε δόσεις 10 mg/kg ΒΣ. Τα κουνέλια υποβλήθηκαν σε ξύρισμα αυτιών άμφω και ακολούθησε ενδοφλέβια έγχυση 3 ml Visudyne (1mg/ml) στην επιπολής ωτιαία φλέβα. Στη συνέχεια, τα επιπολής ωτιαία αγγεία του έτερου (της ενδοφλέβιας έγχυσης) ωτός, υπεβλήθησαν άμεσα σε διοδικό laser (Visulas 690) με παραμέτρους: μέγεθος στόχου 5000 microns, χρόνο εφαρμογής 5 λεπτά, και χρήση ειδικής οπτικής ίνας με έξοδο 25 mW.

Κάθε πειραματόζωο ακτινοβολήθηκε (laser) σε 2 σημεία: ένα σε κεντρικό αγγείο και ένα σε περιφερικό – μικρότερο αγγείο (βλέπε σχήμα).



Εικόνα 4. (σχήμα) 2 laser spots, σε αυτί κουνελιού

*Αποτελέσματα:* Τα πειραματόζωα επανεξετάστηκαν μετά 24 ώρες υπό γενική αναισθησία, όπου αξιολογήσαμε τη ροή των ακτινοβολημένων αγγείων με διαφανοσκόπηση· η εξέταση επιβεβαίωσε την ύπαρξη θρόμβου σε όλα τα πειραματόζωα.



Εικόνα 5. Φωτογραφία κατά τη διαφανοσκόπηση αυτιού στο πείραμα θρόμβωσης με visudyne. Παρατηρούνται διασταλμένα τα περιφερικότερα αγγεία, και κατακερματισμός της ροής – μεγάλη εξασθένιση κεντρικότερα

2.2.1.2. Πείραμα φωτοθρόμβωσης με φθαλοκυανίνη και διοδικό laser 670, σε επιπολής φλέβα αυτιού κουνελιού: επανάληψη – ταυτοποίηση μεθόδου με μεγαλύτερο χρόνο παρακολούθησης

*Σκοπός:* Η ανάπτυξη πειραματικού μοντέλου φωτοδυναμικής θρόμβωσης επιπολής ωτιαίων αγγείων κουνελιού με χρήση φθαλοκυανίνης, με παρακολούθηση για 48 ώρες.

*Υλικό – Μέθοδος:* Στο πείραμα συμπεριλήφθησαν 3 κουνέλια βάρους 2750 έως 3000 gr. Υπεβλήθησαν σε υποδόρια αναισθησία όπως στο πείραμα 2.2.1.1. Τα κουνέλια υπεβλήθησαν σε ξύρισμα αυτιών άμφω, και έλαβαν ενδοφλέβια φθαλοκυανίνη 5 mg /Kg ΒΣ στην επιπολής ωτιαία φλέβα. Στη συνέχεια ακολούθησε εφαρμογή διοδικού laser (670) για χρόνο 5 min στα 20 mW σε όλα τα πειραματόζωα στην επιπολής ωτιαία φλέβα του έτερου (της ενδοφλέβιας έγχυσης) ωτός.

*Αποτελέσματα:* Τα πειραματόζωα εξετάστηκαν με διαφανοσκόπηση, αμέσως μετά την ακτινοβολήση των επιπολής φλεβών υπό γενική αναισθησία, όπου επιβεβαιώθηκε η απόφραξη της ροής των ακτινοβολημένων αγγείων· επανεξετάστηκαν μετά 48 ώρες όπου διαπιστώθηκε ότι η εικόνα – ροή του αγγείου παρέμεινε αμετάβλητη.

2.2.1.3. Πείραμα φωτοθρόμβωσης με φθαλοκυανίνη σε επιπολής φλέβα αυτιού κουνελιού (ιστολογία)

*Σκοπός:* Η φωτοδυναμική θρόμβωση με φθαλοκυανίνη σε επιπολής φλέβα αυτιού κουνελιού, με ιστολογική επιβεβαίωση της παρουσίας του θρόμβου και σύγκριση με μάρτυρες (μόνο ακτινοβολήση, χωρίς φθαλοκυανίνη)

*Υλικό – Μέθοδος I:* Στο πείραμα συμπεριλήφθησαν 4 κουνέλια βάρους 3200 έως 3800 gr. Υπεβλήθησαν σε υποδόρια αναισθησία όπως στο πείραμα 2.2.1.1. Τα κουνέλια υπεβλήθησαν σε ξύρισμα αυτιών άμφω και έλαβαν ενδοφλέβια φθαλοκυανίνη 5 mg /Kg ΒΣ στην επιπολής ωτιαία φλέβα (τα πειραματόζωα 1 και 4). Στη συνέχεια ακολούθησε εφαρμογή διοδικού laser (670) για χρόνο 5 min στα 20

mW σε όλα τα πειραματόζωα στην επιπολής ωτιαία φλέβα του έτερου –της ενδοφλέβιας έγχυσης– ωτός (ακτινοβολήση 2 σημείων, κεντρικού και περιφερικού αγγείου).

Ειδικότερα:

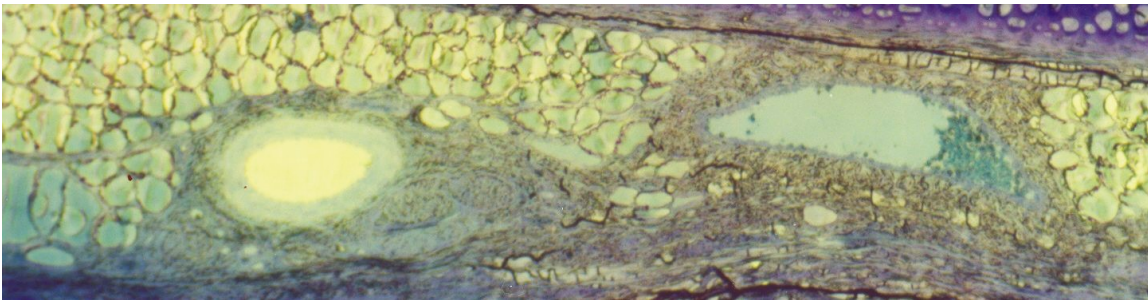
Πειραματόζωα Νο 1, 4 (αλφοί): χορηγήθηκε ενδοφλέβια φθαλοκυανίνη 5mg/KgBΣ.

Πειραματόζωα Νο 2, 3: λευκό και γκρι αντίστοιχα, δεν χορηγήθηκε φθαλοκυανίνη.

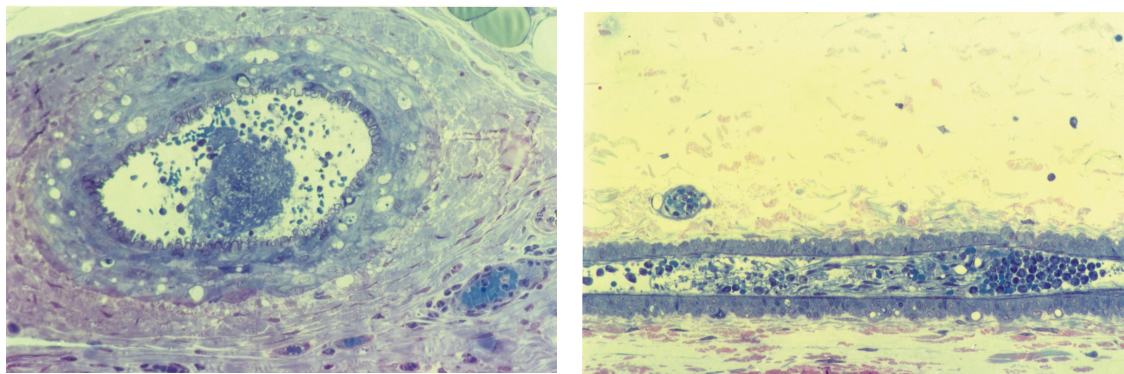
*Αποτελέσματα 1:* Η εξέταση με διαφανοσκόπηση αμέσως μετά την ακτινοβολήση έδειξε για τα πειραματόζωα 1 και 4 διακοπή της ροής και στα 2 σημεία, ενώ έδειξε τοπικά οίδημα χωρίς διακοπή της ροής για τα πειραματόζωα 2 και 3.

*Μέθοδος 2:* 16 – 17 ώρες αργότερα, ακολούθησε θανάτωση των κουνελιών. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν και μονιμοποιήθηκαν ιστοτεμάχια από την περιοχή των θρομβωμένων με laser αγγείων, σε διάλυμα γλουταραλδεΐδης (4 δείγματα), τα οποία προετοιμάστηκαν για ιστολογία με το ερώτημα της ύπαρξης θρόμβου ενδοαγγειακά.

*Αποτελέσματα 2 - Ιστολογία:*



Εικόνα 6. Φωτονική μικροσκοπία: δείγμα 2 (ωτιαία φλέβα κονίκλου, μόνο laser), διακρίνεται αριστερά η αρτηρία και δεξιά η φλέβα, χωρίς θρόμβωση



Εικόνα 7. Φωτονική μικροσκοπία: Επιπολής ωτιαία αγγεία κονίκλου, μετά φωτοθρόμβωση με φθαλοκυανίνη. Δείγμα 1 (αριστερά): αρτηρία και μικρές παρακαείμενες φλέβες με θρόμβο. Δείγμα 4 (δεξιά): διακρίνεται φλέβα με εμφανή παρουσία θρόμβου στον αυλό της

*Συμπέρασμα από πείραμα 2.2.1.3:* Σ' αυτό το πείραμα προκαλέσαμε επιτυχώς θρόμβωση με φωτοδυναμική θεραπεία σε επιπολής ωτιαία αγγεία κουνελιού (επαναληψιμότητα πειράματος). Επιβεβαιώσαμε με ιστολογία την ύπαρξη του θρόμβου ενδοαγγειακά στα πειραματόζωα που είχαμε κλινική ένδειξη διακοπής της ροής, ενώ με την απουσία θρόμβου στα πειραματόζωα με laser μόνο (χωρίς φθαλοκυανίνη) δείξαμε ότι η ύπαρξη του θρόμβου – απόφραξης δεν οφείλεται στην θερμική επίδραση του laser.

Επόμενο βήμα ήταν η εφαρμογή θρομβολυτικού παράγοντα σε διάφορες συγκεντρώσεις υποδόρια και παρακαείμενα του θρομβωμένου αγγείου και ιστολογική διερεύνηση του θρόμβου.

#### 2.2.1.4. Πείραμα φωτοθρόμβωσης (αντί κουνελιού) – εξωαγγειακής θρομβόλυσης με διάφορες δόσεις tPA - ιστολογία

*Σκοπός:* Το πείραμα αυτό είχε σκοπό την αξιολόγηση με ιστολογία της εξωαγγειακής θρομβόλυσης διαφόρων δόσεων tPA σε μοντέλο φωτοδυναμικής θρόμβωσης με βερτεπορφίνη (visudyne) επιπολής φλέβας αυτιού κουνελιού.

*Υλικό – Μέθοδος:* Στο πείραμα συμπεριλήφθησαν 7 κουνέλια ( 2 γκρίζα, 2 λευκά, 1 γκρι-καφέ, 1 λευκό – γκρι, 1 καφέ) βάρους 2800 – 3000 gr.

Φάση 1: Αρχικά τα πειραματόζωα υπεβλήθησαν σε αναισθησία και ξύρισμα αυτιών άμφω και ακολούθησε ενδοφλέβια χορήγηση 2.8 – 3 ml Visudyne (1mg/1ml) στην επιπολής περιφερική ωτιαία φλέβα. Στη συνέχεια, ακολούθησε εφαρμογή διοδικού laser (690) με μέγεθος στόχου 5000 microns, για χρόνο 180 sec στα 25 mW σε όλα τα πειραματόζωα, στην επιπολής κεντρική ωτιαία φλέβα του έτερου (της ενδοφλέβιας έγχυσης) ωτός.

*Αποτελέσματα 1:* Ακολούθησε κλινική επιβεβαίωση της θρόμβωσης (διακοπή της ροής με διαφανοσκόπηση – retro illumination) σε όλα τα πειραματόζωα.

Φάση 2: Με τα από 24 ώρες τα πειραματόζωα εξετάστηκαν υπό αναισθησία (πλην ενός λευκού κουνελιού, που διαπιστώθηκε ότι είχε απεβιώσει) με διαφανοσκόπηση και αναγνωρίστηκε σε όλα η διακοπή της ροής (ύπαρξη θρόμβου). Στη συνέχεια ακολούθησε στα

Πειραματόζωο No 1: γκρίζο, Πειραματόζωο No 4: γκρι - καφέ

υποδόρια ένεση διαλύματος tPA δίπλα στο θρομβωμένο αγγείο σε ποσότητα 100 µg/0,1 ml

Πειραματόζωο No 2: γκρίζο, Πειραματόζωο No 5: λευκό - γκρι

υποδόρια ένεση διαλύματος tPA δίπλα στο θρομβωμένο αγγείο σε ποσότητα 10 µg/0,1ml

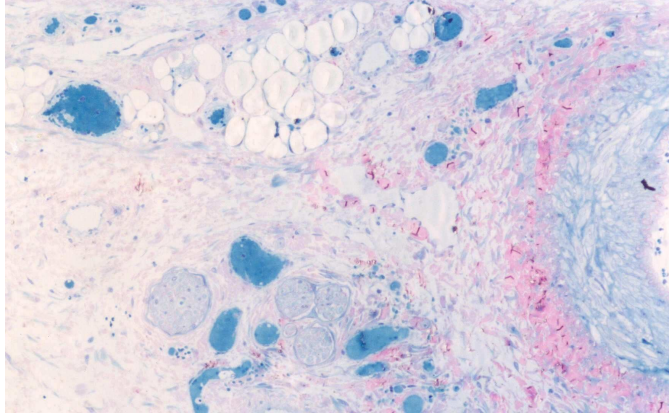
Πειραματόζωο No 3 : λευκό, Πειραματόζωο No 6: καφέ

υποδόρια ένεση διαλύματος tPA δίπλα στο θρομβωμένο αγγείο σε ποσότητα 50 µg/0,1ml

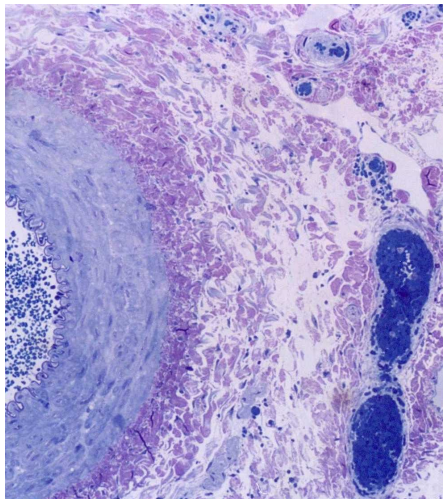
6 ώρες μετά από την υποδόρια ένεση tPA, ακολούθησε θανάτωση των κουνελιών υπό αναισθησία· στη συνέχεια παρασκευάστηκαν και μονιμοποιήθηκαν ιστοτεμάχια από την περιοχή των θρομβωμένων με laser αγγείων, σε διάλυμα γλουταραλδεΰδης (6 δείγματα), τα οποία προετοιμάστηκαν για ιστολογία με το ερώτημα της ύπαρξης θρόμβου ενδοαγγειακά. Ειδικότερα εξετάστηκαν τα δείγματα 1, 2,3,4,5 και 6 για τα πειραματόζωα 1, 2,3,4,5 και 6 αντίστοιχα.



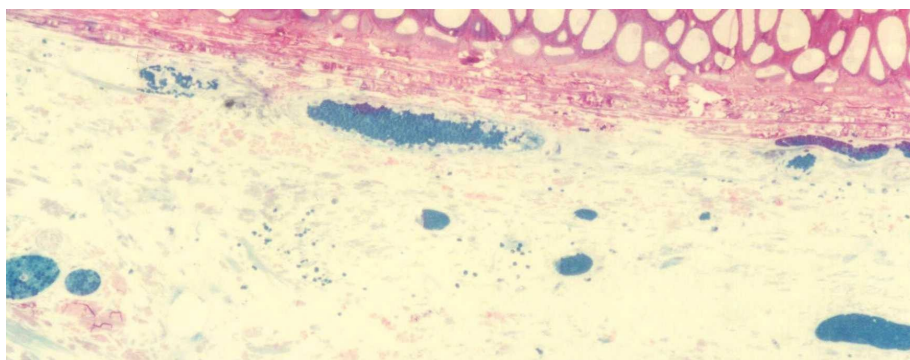
Αποτελέσματα 2 - Ιστολογία:



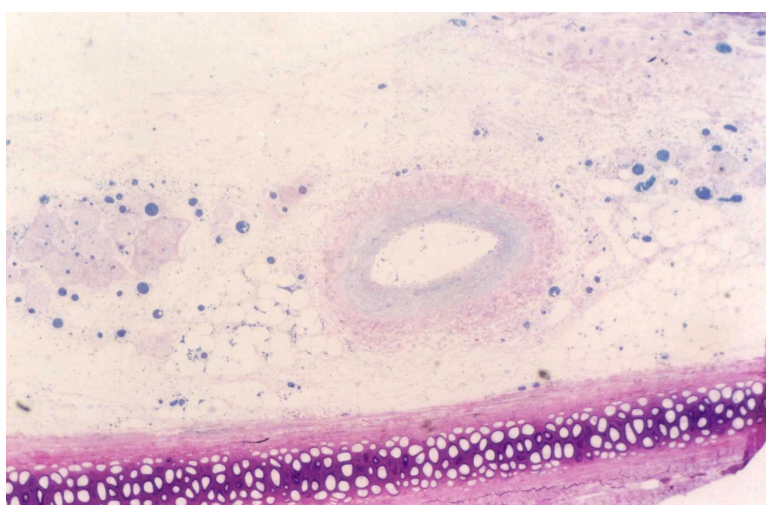
Εικόνα 8. Φωτονική μικροσκοπία. Δείγμα 1: φωτοθρόμβωση ωτιαίας φλέβας κουνελιού, με υποδόρια ένεση διαλύματος tPA 100  $\mu$ g/ 0,1ml. Διακρίνεται η αρτηρία δεξιά χωρίς θρόμβωση, ενώ όλες οι μικρές φλέβες στην περιοχή διακρίνονται θρομβωμένες



Εικόνα 9. Φωτονική μικροσκοπία. Δείγμα 4: φωτοθρόμβωση ωτιαίας φλέβας κουνελιού, με υποδόρια ένεση διαλύματος tPA 100  $\mu$ g/ 0,1ml. Διακρίνεται η αρτηρία αριστερά χωρίς θρόμβωση, ενώ όλες οι μικρές φλέβες στην περιοχή διακρίνονται θρομβωμένες



Εικόνα 10. Φωτονική μικροσκοπία. Δείγμα 2: φωτοθρόμβωση ωτιαίας φλέβας κουνελιού, με υποδόρια ένεση διαλύματος tPA 10  $\mu\text{g}/0,1\text{ml}$ . Διακρίνονται θρομβωμένες οι φλέβες στην περιοχή, εκτός από μια φλέβα πάνω αριστερά



Εικόνα11. Φωτονική μικροσκοπία. Δείγμα 3: φωτοθρόμβωση ωτιαίας φλέβας κουνελιού, με υποδόρια ένεση διαλύματος tPA 50  $\mu\text{g}/0,1\text{ml}$ . Διακρίνεται η αρτηρία στο κέντρο χωρίς θρόμβωση, ενώ όλες οι μικρές φλέβες στην περιοχή διακρίνονται θρομβωμένες

*Συμπέρασμα από πείραμα 2.2.1.4:* Το tPA αν χορηγηθεί υποδόρια σε δόσεις 10  $\mu\text{g}/0,1\text{ml}$ , 50  $\mu\text{g}/0,1\text{ml}$ , 100  $\mu\text{g}/0,1\text{ml}$ , δεν είναι ικανό να προκαλέσει λύση του

θρόμβου του φλεβικού δικτύου, σε αυτό το πειραματικό μοντέλο φωτοθρόμβωσης ωτιαίας φλέβας κουνιού.

Επόμενο βήμα ήταν η χορήγηση υποδόρια τροποποιημένου θρομβολυτικού παράγοντα (tPA σε λιποσώματα), σε μορφή που έχει καλύτερη διαπερατότητα από μεμβράνες και μεγαλύτερη χρονική παραμονή στους ιστούς, και η διερεύνηση με ανοσοϊστοχημεία της παρουσίας του στον αυλό των αγγείων.

#### 2.2.1.5. Πείραμα φωτοθρόμβωσης (αυτί κουνιού) – εξωαγγειακής θρομβόλυσης με δόσεις tPA σε λιποσώματα (διάφορους τύπους), διερεύνηση με ανοσοϊστοχημεία

**Σκοπός:** Το πείραμα αυτό είχε σκοπό την αξιολόγηση με ανοσοϊστοχημεία της ικανότητας του tPA σε λιποσώματα να διαπερνά το αγγειακό τοίχωμα και να αναγνωρίζεται ενδοαγγειακά μετά από εξωαγγειακή (υποδόρια) χορήγηση σε μοντέλο φωτοδυναμικής θρόμβωσης με βερτεπορφίνη (visudyne) επιπολής φλέβας αυτιού κουνιού.

**Υλικό – Μέθοδος:** Στο πείραμα συμπεριλήφθησαν 3 κουνέλια (ένα λευκό – καφέ, ένα γκρι, ένα γκρι – μαύρο) βάρους από 2600 – 3200 gr.

**Φάση 1:** Τα πειραματόζωα υπεβλήθησαν σε αναισθησία (Μεθοδολογία, §1.2.1.1), και ξύρισμα αυτιών άμφω. Ακολούθησε ενδοφλέβια χορήγηση 2,8 – 3 ml Visudyne (1mg/1ml) στην επιπολής ωτιαία φλέβα. Στη συνέχεια ακολούθησε εφαρμογή διοδικού laser (690) με μέγεθος στόχου 6200 microns, για χρόνο 180 sec στα 25 mW σε όλα τα πειραματόζωα, στην επιπολής κεντρική ωτιαία φλέβα του έτερου (της ενδοφλέβιας έγχυσης) ωτός. Η θρόμβωση (διακοπή της ροής) επιβεβαιώθηκε κλινικά (διαφανοσκόπηση) σε όλα τα πειραματόζωα.

**Φάση 2:** Την επόμενη μέρα υπό γενική αναισθησία (υποδόρια), ελέγχονται όλα τα πειραματόζωα πριν την έγχυση φαρμάκου και αναγνωρίζονται όλα ως + για ύπαρξη θρόμβου. Στη συνέχεια ακολούθησε στο Πειραματόζωο No 1 (λευκό – καφέ):

Υποδόρια ένεση διαλύματος tPA δίπλα στο θρομβωμένο αγγείο σε ποσότητα 31,2 µg tPA/0,1ml διαλύματος λιποσωμάτων DSPC/PG/Chol.<sup>i</sup>

Πειραματόζωο Νο 2 (γκρι):

Υποδόρια ένεση διαλύματος tPA δίπλα στο θρομβωμένο αγγείο σε ποσότητα 28,2 µg tPA/ 0,1ml διαλύματος λιποσωμάτων PC/PG/Chol.

Πειραματόζωο Νο 3 (γκρι – μαύρο):

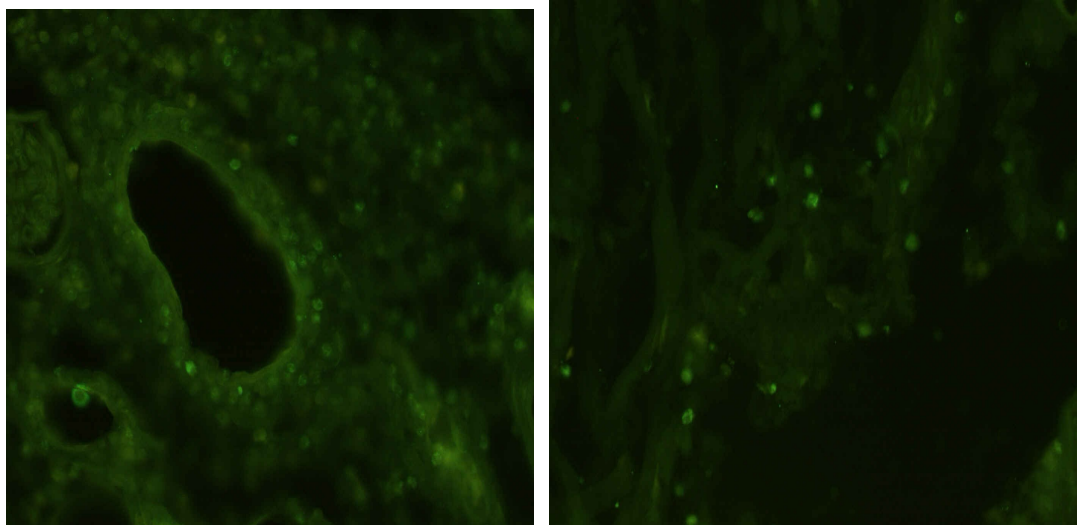
Υποδόρια ένεση διαλύματος λιποσωμάτων μόνο (χωρίς tPA) δίπλα στο θρομβωμένο αγγείο σε ποσότητα: 0,1 ml.

**Φάση 3:** Στη συνέχεια (6 ώρες μετά τις υποδόριες ενέσεις θρομβολυτικού) ακολούθησε θανάτωση των κουνελιών υπό αναισθησία, τεμαχισμός και διατήρηση των με laser θρομβωμένων αγγείων σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 10% (προετοιμασία για ανοσοϊστοχημεία). Ειδικότερα παρασκευάστηκαν – μονιμοποιήθηκαν τα δείγματα 1, 2 και 3 για τα πειραματόζωα 1, 2 και 3 αντίστοιχα.

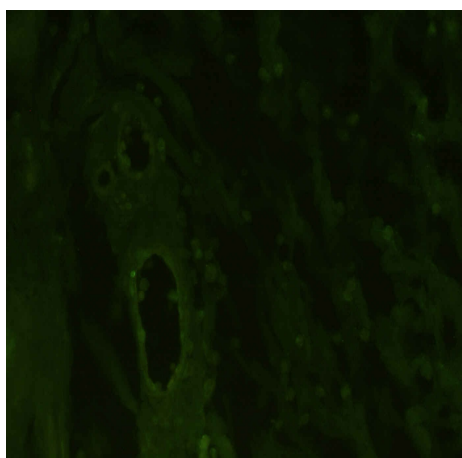
Το ερώτημα που προέκυπτε και αναμενόταν να απαντηθεί με την **ανοσοϊστοχημεία ήταν:** ανιχνεύεται tPA ενδοαγγειακά στα θρομβωμένα αγγεία;

---

<sup>i</sup> PC liposomes: φωσφατιδιλχολίνη (phosphatidylcholine), DMPC (di-myristoylglycero-PC), DPPC (dipalmitoylglycero-PC), DSPC (di-stearoylglycero-PC) και PG: φωσφατι-δυσλγλυκερόλη (phosphatidylglycerol).

*Αποτελέσματα - Ανοσοϊστοχημεία*

Εικόνα 12. Εικόνα φθορισμού δειγμάτων 1(αριστερά) και 2 (δεξιά). Διακρίνεται αρτηρία και μικρά αγγεία. Διακρίνεται φθορισμός από tPA στο μεσέγχυμα αλλά όχι στα αγγεία. Μέτριος φθορισμός από τη βασική μεμβράνη (ενδοθήλιο)



Εικόνα 13. Εικόνα φθορισμού δείγματος 3. Διακρίνεται ήπιος φθορισμός από τη βασική μεμβράνη και το διάμεσο ιστό, πολύ ασθενέστερος σε σχέση με τα δείγματα 1 και 2 που ενέθηκε tPA

*Συμπέρασμα από πείραμα 2.2.1.5.:* Σε υποδόρια ένεση το tPA σε λιποσώματα (30 µg tPA/ 0,1 ml) δίπλα από θρομβωμένη ωτιαία φλέβα κονίκλου, δεν κατορθώνει να διαπεράσει το αγγειακό τοίχωμα και να αναγνωρισθεί ενδοαγγειακά.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Στο πείραμα 1 αναπτύξαμε πειραματικό μοντέλο φωτοδυναμικής θρόμβωσης επιπολής ωτιαίων αγγείων κουνελιού με χρήση φθαλοκυανίνης και laser 670 αλλά και με χρήση visudyne και laser 690. Στη συνέχεια επιβεβαιώσαμε ιστολογικά την παρουσία του θρόμβου. Ελέγξαμε ιστολογικά διάφορες δόσεις tPA υποδόρια (10, 50, 100 µg/ 0,1 ml) όπου δείξαμε ότι ο θρόμβος παραμένει αμετάβλητος και τέλος ελέγξαμε με ανοσοϊστοχημεία την ικανότητα του tPA σε λιποσώματα, αν ενεθεί εξωαγγειακά (υποδόρια), να αποκτήσει πρόσβαση στον αυλό του αγγείου, όπου δείξαμε ότι το tPA, **δεν αναγνωρίζεται** στον αυλό του αγγείου, όταν ενεθεί εξωαγγειακά.

Επόμενο βήμα ήταν να επαναλάβουμε παρόμοια σειρά πειραμάτων σε οφθαλμολογικό μοντέλο θρόμβωσης και να την αξιολογήσουμε.

### **2.2.2. ΠΕΙΡΑΜΑ 2**

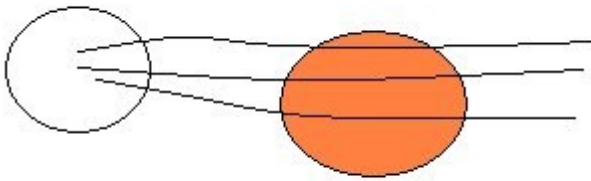
Ο σχεδιασμός του πειράματος αυτού περιελάμβανε την ανάπτυξη πειραματικού μοντέλου φωτοδυναμικής θρόμβωσης αμφιβληστροειδικών αγγείων κουνελιού, αξιολόγηση της φυσικής πορείας της θρόμβωσης και, τέλος, την ιστολογική επιβεβαίωση παρουσίας του θρόμβου.

#### 2.2.2.1. Φωτοδυναμική θρόμβωση αμφιβληστροειδικής φλέβας κουνελιού (visudyne)

*Σκοπός:* Το πείραμα αυτό περιελάμβανε την προσπάθεια για ανάπτυξη πειραματικού μοντέλου φωτοδυναμικής θρόμβωσης αμφιβληστροειδικών αγγείων κουνελιού με βερτεπορφίνη (visudyne).

*Υλικό – Μέθοδος:* Στο πείραμα συμπεριελήφθησαν 4 πειραματόζωα βάρους 3000 - 3500 gr περίπου. Όλα υπεβλήθησαν σε υποδόρια αναισθησία (§1.2.1.1.) – μυδρίαση αμφοτέρων των οφθαλμών με σταγόνες τροπικαμίδης – φαινυλεφρίνης και στη συνέχεια φλεβοκέντηση ωτιαίας φλέβας, με έγχυση 3-3,5 ml visudyne σε δόσεις 1mg/kg.

Τα πειραματόζωα 1 και 2 (αλφοί) ακτινοβολήθηκαν άμεσα και στους 2 οφθαλμούς, με διοδικό laser (Visulas 690) για 5 min με μέγεθος στόχου 6000 microns (βλέπε σχήμα).



Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ακτινοβολήσης με διοδικό laser. Δεξιά με χρώμα, απεικονίζεται ο laser στόχος

*Αποτελέσματα 1:* Το πειραματόζωο 1 απεβίωσε κατά τη διαδικασία της ακτινοβολήσης του 2<sup>ου</sup> οφθαλμού. Για το πειραματόζωο 2, στον ΔΟ κατά την ακτινοβολήση διαπιστώθηκε (βυθοσκόπηση) διακοπή της ροής του αγγειακού μίσχου, ενώ στον ΑΟ δεν τεκμηριώθηκε θρόμβωση κλινικά.

Η εξέταση-βυθοσκόπηση που επαναλήφθηκε σε 24 ώρες (υπό μυδρίαση-αναισθησία) έδειξε και στους δυο οφθαλμούς: α. μεγάλο οίδημα επιπεφυκότα και θρόμβωση αγγείων κερατοεπιπεφυκότα, β. εκτεταμένη ορώδη αποκόλληση αμφιβληστροειδούς και πιθανά χοριοειδούς, με απόφραξη αγγείων αμφιβληστροειδούς.

*Συμπεράσματα 1:* Σ' αυτή τη φάση αξιολογήθηκε η ανάγκη μείωσης ενέργειας του laser αλλά και του χρόνου εφαρμογής για αποφυγή αποκόλλησης, ενώ τέθηκε ο προβληματισμός για την συνέχιση των κουνελιών αλφών, για ελάττωση απορρόφησης στους βαθύτερους ιστούς (χοριοειδής).

*Μέθοδος 2:* Στα άλλα 2 πειραματόζωα (πειραματόζωο 3 – καφέ χρώματος, και πειραματόζωο 4 γκρι χρώματος) η διαδικασία του πειράματος ήταν ίδια εκτός από την ακτινοβολία με διοδικό laser (Visulas 690), όπου μειώθηκε ο χρόνος εφαρμογής στα 3 min (180 sec) και το μέγεθος στόχου στα 4500 microns. Και στα 2 πειραματόζωα ακτινοβολήθηκε πρώτα ο δεξιός οφθαλμός (ΔΟ) και ακολούθησε ο αριστερός (ΑΟ).

*Αποτελέσματα 2:* Η εξέταση – βυθοσκόπηση σε 24 ώρες υπό αναισθησία – μυδρίαση έδειξε και για τα δυο πειραματόζωα (3 και 4) σε αμφοτέρους τους οφθαλμούς εντοπισμένη ορώδη αποκόλληση αμφιβληστροειδούς και πιθανά χοριοειδούς στην περιοχή της ακτινοβολήσης, χωρίς εμφανή θρόμβωση.

*Συμπεράσματα 2:* Σ' αυτή τη φάση **αποφασίστηκε να εγκαταλειφθεί το μοντέλο της φωτοδυναμικής θρόμβωσης αγγείων αμφ/δους με visudyne** γιατί η ουδός που προκαλεί απόφραξη αγγείων, είναι μεγαλύτερη από τη δόση (φάρμακο-ακτινοβολία) που προκαλεί χοριοειδική – αμφιβληστροειδική αποκόλληση.

Επόμενο βήμα ήταν η επανάληψη του πειράματος με χρήση της φθαλοκυανίνης ως φωτοευαισθητοποιητή.

#### 2.2.2.2. Φωτοδυναμική θρόμβωση αγγείων αμφιβληστροειδούς κουνελιού, με χρήση φθαλοκυανίνης

*Σκοπός:* Το πείραμα αυτό περιλάμβανε την προσπάθεια για ανάπτυξη πειραματικού μοντέλου φωτοδυναμικής θρόμβωσης αμφιβληστροειδικών αγγείων κουνελιού με χρήση φθαλοκυανίνης.

*Υλικό – Μέθοδος:* Στο πείραμα συμπεριλήφθησαν 6 πειραματόζωα βάρους 2750 – 3000 gr περίπου. Όλα υπεβλήθησαν σε υποδόρια αναισθησία (§1.2.1.1.) – μυδρίαση αμφοτέρων των οφθαλμών με σταγόνες τροπικαμίδης – φαινυλεφρίνης.

Στη συνέχεια και μετά από φλεβοκέντηση ωτιαίας φλέβας, τα πειραματόζωα 1 (λευκό) και 2 (γκρι – καφέ) υπεβλήθησαν σε έγχυση φθαλοκυανίνης (1 ml



διαλύματος 15mg/ml) σε δόσεις 5 mg/kg ΒΣ · ακολούθησε άμεσα ακτινοβολήση με διοδικό laser (690) για 10 min στα 4,5 mW.

Και στα 2 πειραματόζωα ακτινοβολήθηκε μόνο ένας οφθαλμός και συγκεκριμένα ο ρινικός αγγειακός μίσχος (λόγω του ότι σε χαμηλές ενέργειες, απαιτείται αύξηση του χρόνου, τα 10 – 15 λεπτά, είναι χρόνος που το πειραματόζωο έχει εκπλύνει το φάρμακο από την κυκλοφορία).

*Αποτελέσματα 1:* Η εξέταση – βυθοσκόπηση σε 24 ώρες υπό αναισθησία – μυδρίαση δεν έδειξε ευρήματα θρόμβωσης σε κανένα πειραματόζωο.

*Συμπεράσματα 1:* Σ' αυτή τη φάση αποφασίστηκε να αυξηθεί η ενέργεια στο μοντέλο της φωτοθρόμβωσης με φθαλοκυανίνη.

*Μέθοδος 2:* Στα πειραματόζωα 3 και 4 (αλφοί) μετά από αναισθησία – μυδρίαση, χορηγήθηκε ενδοφλέβια φθαλοκυανίνη 6,5 mg/Kg ΒΣ και στην συνέχεια ακτινοβολήθηκαν με laser (670) αμφότεροι οι οφθαλμοί με παραμέτρους: 6 mW για χρόνο 5 min στο πειραματόζωο No 3 και 20 mW για χρόνο 5 min στο πειραματόζωο No 4.

Στο τέλος του πειράματος, διαπιστώθηκε διακοπή της ροής στο θρομβωμένο αγγείο και στα 2 πειραματόζωα – 4 οφθαλμούς (βυθοσκόπηση με Goldman, σε πειραματικό μικροσκόπιο).

*Αποτελέσματα 2:* Η εξέταση 24 ώρες αργότερα υπό αναισθησία – μυδρίαση έδειξε και στους 4 οφθαλμούς εκτεταμένη χοριοειδική αποκόλληση.

*Συμπέρασμα – τροποποιήσεις:* Μετά το εύρημα της χοριοειδικής αποκόλλησης, αποφασίστηκε: 1. η επανάληψη πειράματος με σκούρα κουνέλια (non albinos) και 2. η χρήση πράσινου (ανέρυθρου) φίλτρου κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης για μείωση απορρόφησης φωτός από την σχισμοειδή λυχνία, σε περιοχές που δεν ακτινοβολούνται από laser.

*Μέθοδος 3:* Στα πειραματόζωα 5 και 6 (καφέ και γκρίζο αντίστοιχα) μετά από αναισθησία – μυδρίαση, χορηγήθηκε iv φθαλοκυανίνη 4,5 mg/Kg ΒΣ και στην συνέχεια ακτινοβολήθηκαν με laser (670) αμφότεροι οι οφθαλμοί με παραμέτρους 20

mW για χρόνο 4 min στον παραθηλαίο αμφιβληστροειδικό αγγειακό μίσχο, με χρήση green φίλτρου στο μικροσκόπιο.

Στο τέλος του πειράματος, διαπιστώθηκε διακοπή της ροής στο θρομβωμένο αγγείο και στα 2 πειραματόζωα – 4 οφθαλμούς (βυθοσκόπηση με Goldman).

*Αποτελέσματα 3:* Η εξέταση 24 ώρες αργότερα υπό αναισθησία – μυδρίαση έδειξε και στους 4 οφθαλμούς αποφραγμένα αμφιβληστροειδικά αγγεία στην πλευρά της ακτινοβολήσης, με επικολημένο αμφιβληστροειδή ενώ η βιομικροσκοπική εικόνα παρέμεινε αμετάβλητη για άλλες 48 ώρες.

Επόμενα βήματα ήταν η επανάληψη του πειράματος (έλεγχος επαναληψιμότητας) (2.2.2.3.) και ο έλεγχος της θρόμβωσης σε μεγαλύτερο χρόνο παρακολούθησης (2.2.2.4.).

### 2.2.2.3. Πείραμα φωτοθρόμβωσης με φθαλοκυανίνη και διοδικό laser 670, σε αμφιβληστροειδικά αγγεία κουνελιού

*Σκοπός:* Το πείραμα αυτό περιλάμβανε την επανάληψη του Πειράματος 2.2.2.2., ειδικότερα της Μεθόδου 3, για έλεγχο της επαναληψιμότητας της μεθόδου φωτοδυναμικής θρόμβωσης με φθαλοκυανίνη και διοδικό laser 670, σε αμφιβληστροειδικά αγγεία κουνελιού.

*Υλικό – Μέθοδος :* Στο πείραμα συμπεριλήφθησαν 2 πειραματόζωα βάρους 2950-3000 gr. Η μεθοδολογία του πειράματος ήταν ίδια με αυτή που περιγράφεται στη μέθοδο 3 του πειράματος 2.2.2.2. (αναισθησία-μυδρίαση-φθαλοκυανίνη-laser). Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως επιτυχής για θρόμβωση (μετά βυθοσκόπηση με Goldman) και στους 4 οφθαλμούς σε χρόνο 3-3,5 λεπτά.

*Αποτελέσματα :* Μετά 36 ώρες ακολούθησε επανεξέταση υπό αναισθησία – μυδρίαση όπου επιβεβαιώθηκε η θρόμβωση βιομικροσκοπικά και στους 4 οφθαλμούς.

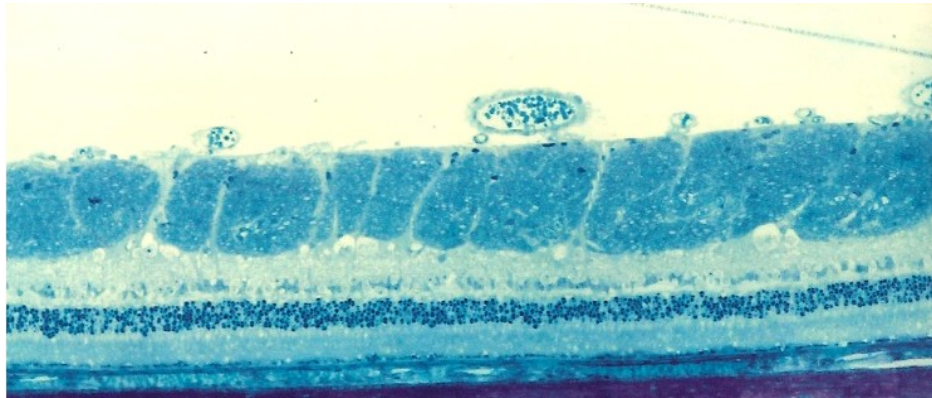
2.2.2.4. Πείραμα φωτοθρόμβωσης με φθαλοκυανίνη και διοδικό laser 670, σε αμφιβληστροειδικά αγγεία κουνελιού (αξιολόγηση φυσικής πορείας της νόσου)

*Σκοπός:* Το πείραμα αυτό περιελάμβανε την επανάληψη του πειράματος 2.2.2.3. για έλεγχο της θρόμβωσης σε μεγαλύτερο χρόνο παρακολούθησης, αλλά και ιστολογική ταυτοποίηση του θρόμβου.

*Υλικό – Μέθοδος :* Στο πείραμα συμπεριλήφθησαν 6 πειραματόζωα βάρους 2850 – 3000 gr (υπ' αριθμόν 1,2,3,4,5,6). Η μεθοδολογία του πειράματος ήταν ίδια με αυτή που περιγράφεται στη μέθοδο 3 του πειράματος 2.2.2.2. (αναισθησία-μυδρίαση-φθαλοκυανίνη-laser), αλλά και 2.2.2.3. Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως επιτυχής για θρόμβωση (μετά βυθοσκόπηση με Goldman) και στους 2 οφθαλμούς σε χρόνο 3-3,5 λεπτά. Το πειραματόζωο 2 απεβίωσε στην αναισθησία στην αρχή του πειράματος.

*Αποτελέσματα 1:* Τα πειραματόζωα παρακολουθήθηκαν για χρόνο 14,5 ημερών όπου η διακοπή της ροής των θρομβωμένων αγγείων παρέμεινε αμετάβλητη (μετά εξέταση υπό αναισθησία – μυδρίαση).

*Μέθοδος 2:* 19 ημέρες μετά τη θρόμβωση ακολούθησε θανάτωση του πειραματόζωου 3 υπό αναισθησία, εξόρυξη του ΔΟ και παρασκευή ιστοτεμαχίου από την περιοχή των θρομβωμένων αγγείων με μονιμοποίηση σε γλουταραλδεΰδη, για ιστολογική επιβεβαίωση του θρόμβου.

*Αποτελέσματα 2 - Ιστολογία*

Εικόνα 15. Φωτονική μικροσκοπία: δείγμα 3: διακρίνεται φυσιολογικός αμφιβληστροειδής με θρομβωμένο επιπολής αγγείο, ενώ τα μικρότερα είναι ανοικτά

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ**

Στο πείραμα 2 αναπτύξαμε πειραματικό μοντέλο φωτοδυναμικής θρόμβωσης αμφιβληστροειδικών αγγείων κουνελιού με χρήση φθαλοκυανίνης και laser 670, που επιβεβαιώσαμε ιστολογικά. Στη συνέχεια, παρακολουθήσαμε την πορεία της θρόμβωσης και διαπιστώσαμε ότι παραμένει αμετάβλητη για χρόνο τουλάχιστον 14,5 ημερών.

Επόμενο βήμα ήταν να επαναλάβουμε παρόμοια σειρά πειραμάτων στο μοντέλο θρόμβωσης αμφιβληστροειδικών αγγείων, να χορηγήσουμε ενδοϋαλοειδικά τον θρομβολυτικό παράγοντα (tPA) σε διάφορες συγκεντρώσεις και να αξιολογήσουμε την κλινική πορεία (αποτελεσματικότητα – ασφάλεια).

**2.2.3. ΠΕΙΡΑΜΑ 3**

*Σκοπός:* Ο σχεδιασμός του πειράματος περιλάμβανε φωτοδυναμική θρόμβωση με φθαλοκυανίνη και διοδικό laser 670 σε αμφιβληστροειδικά αγγεία κουνελιού και ενδοϋαλοειδική ένεση tPA σε δόσεις 15μg/0,1ml, 50μg/0,1ml και 100μg/0,1ml για

σύγκριση της πορείας της θρόμβωσης σε σχέση με οφθαλμούς που δεν έλαβαν θρομβολυτικό.

*Υλικό – Μέθοδος:* Στο πείραμα συμπεριλήφθησαν 6 πειραματόζωα βάρους 2750 – 3000 gr. Η μεθοδολογία του πειράματος ήταν ίδια με αυτή που περιγράφεται στο πείραμα 2.2.2.3. (αναισθησία-μυδρίαση-φθαλοκυανίνη-laser) και στους 2 οφθαλμούς κάθε πειραματόζωου.

Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως επιτυχής για θρόμβωση (μετά βυθοσκόπηση με Goldman) σε όλους τους οφθαλμούς σε χρόνο 3-3,5 λεπτά.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν ενδοϋαλοειδικές ενέσεις με tPA στους Δε οφθαλμούς όλων των πειραματόζωων (οφθαλμοί μελέτης), ενώ στους Αρ οφθαλμούς έγινε ενδοϋαλοειδική ένεση 0,10 ml διαλύματος BSS (οφθαλμοί ελέγχου), όπως περιγράφεται στην §1.2.2.: Το Πειραματικό Μοντέλο Θρόμβωσης: ειδικότερα στα πειραματόζωα 1 και 2 (ΔΟ) έγινε ενδοϋαλοειδική ένεση 15μg tPA/0,1ml, στα πειραματόζωα 3 και 4 (ΔΟ) ενδοϋαλοειδική ένεση 50μg tPA/0,1ml και στα πειραματόζωα 5 και 6 (ΔΟ) ενδοϋαλοειδική ένεση 100μg tPA/0,1ml.

*Αποτελέσματα :* όλοι οι οφθαλμοί εξετάστηκαν 24 - 48 ώρες μετά τις ενδοϋαλοειδικές ενέσεις (βυθοσκόπηση υπό αναισθησία – μυδρίαση) όπου διαπιστώθηκε **θρόμβωση σε όλους τους οφθαλμούς** (με αποφραγμένα αμφιβληστροειδικά αγγεία στην πλευρά της ακτινοβολήσης, με επικολημένο αμφιβληστροειδή).

Ακολούθησε επανάληψη ενδοϋαλοειδικών ενέσεων όπως περιγράφεται παραπάνω (ΔΟ tPA, ΑΟ BSS) για τα πειραματόζωα 1 και 2, ενώ η επανεξέταση 24 ώρες αργότερα, υπήρξε χωρίς μεταβολή.

Δεν παρατηρήθηκαν επιπλοκές κατά την διαδικασία της θρόμβωσης ή των ενδοϋαλοειδικών ενέσεων, αλλά ούτε κατά την διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης. Επιπλέον σε έναν οφθαλμό με δόση θρομβολυτικού 100μg tPA/0,1ml (πειραματόζωο 5) παρατηρήθηκε αποκόλληση υαλώδους, χωρίς όμως λύση του θρόμβου ή αποκατάσταση της ροής.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο πείραμα 3, στο πειραματικό μοντέλο φωτοδυναμικής θρόμβωσης αμφιβληστροειδικών αγγείων κουνελιού που περιγράψαμε στο πείραμα 2, χορηγήσαμε ενδοϋαλοειδικά tPA σε τρεις διαφορετικές δόσεις (15μg/0,1ml, 50μg/0,1ml, 100μg/0,1ml). Στη συνέχεια παρακολουθήσαμε την πορεία της θρόμβωσης σε σχέση με τους μάρτυρες (έτερος οφθαλμός κάθε πειραματόζωου, όπου ενέθηκε BSS) και διαπιστώσαμε ότι δεν υπάρχει διαφορά ανάμεσα στις δυο ομάδες: για 24 – 72 ώρες όλοι οι οφθαλμοί διατηρούν την θρόμβωση όπως αυτή προκλήθηκε στην αρχή του πειράματος. Επίσης ένας οφθαλμός στον οποίο ενέθηκε δόση 100μg/0,1ml εμφάνισε αποκόλληση υαλώδους, χωρίς όμως να εμφανίσει σημεία αποκατάστασης της θρόμβωσης.

Επόμενο βήμα ήταν να επαναλάβουμε παρόμοια σειρά πειραμάτων στο μοντέλο θρόμβωσης αμφιβληστροειδικών αγγείων, και να χορηγήσουμε ενδοϋαλοειδικά το θρομβολυτικό παράγοντα (tPA) σε διάφορες συγκεντρώσεις εγκλωβισμένο σε λιποσώματα και να αξιολογήσουμε την κλινική πορεία (αποτελεσματικότητα – ασφάλεια). Η επιλογή των λιποσωμάτων ήταν για να μειωθεί η πιθανότητα πιθανής απενεργοποίησης και για αύξηση της διαπερατότητας διαμέσου των μεμβρανών – φραγμών.

### 2.2.4. ΠΕΙΡΑΜΑ 4

Ο σχεδιασμός του πειράματος αυτού αρχικά περιλάμβανε την αξιολόγηση της συμπεριφοράς διαφόρων τύπων λιποσωμάτων με tPA στην υαλοειδική κοιλότητα, στη συνέχεια τη χορήγηση (στο μοντέλο θρόμβωσης αμφιβληστροειδικών αγγείων) με ενδοϋαλοειδική ένεση του θρομβολυτικού παράγοντα (tPA) εγκλωβισμένο σε λιποσώματα σε διάφορες συγκεντρώσεις, την αξιολόγηση της κλινικής πορείας (αποτελεσματικότητα – ασφάλεια) και σε σχέση με την ένεση tPA μόνη της.

#### 2.2.4.1. Πείραμα ελέγχου συμπεριφοράς λιποσωμάτων με tPA στην υαλοειδική κοιλότητα

*Σκοπός:* Η αξιολόγηση της συμπεριφοράς διαφόρων τύπων λιποσωμάτων με tPA στην υαλοειδική κοιλότητα οφθαλμού κουνελιού

*Υλικό – Μέθοδος :* Χρησιμοποιήθηκαν 4 δείγματα λιποσωμάτων: A-big (μεγάλα) 85,6 µg/ml (t-PA), A-Small 50 µg/ml, B- big 59 µg/ml και B-small 43 µg/ml. Η διαφορά A και B είναι στη λιπιδική σύσταση: τα A είναι PC/Chol (2:1 mol.mol) και τα B είναι PC/PG/Chol (9:1:5).<sup>i</sup>

Στο πείραμα συμπεριλήφθησαν χρησιμοποιήθηκαν 6 πειραματόζωα βάρους 2850-3000 gr. Στους οφθαλμούς των πειραματόζωων, μετά από αναισθησία – μυδρίαση, έγιναν ενδοϋαλοειδικές ενέσεις:

στα πειραματόζωα 1 και 4 (ΔΟ) ενέθηκε 0,1 ml διαλύματος λιποσωμάτων με tPA A-big, στα πειραματόζωα 2 και 5 (ΔΟ) ενέθηκε 0,1 ml διαλύματος λιποσωμάτων με tPA A-small, στα πειραματόζωα 3 και 6 ενέθηκε στους ΔΟ 0,1 ml διαλύματος λιποσωμάτων B-big και στους ΑΟ 0,1 ml διαλύματος λιποσωμάτων B-small.

*Αποτελέσματα:* Τα πειραματόζωα εξετάστηκαν (υπό αναισθησία – μυδρίαση) σε 48 ώρες για έλεγχο διαύγειας υαλώδους, λοίμωξης κλπ: η βυθοσκόπηση έδειξε για τα πειραματόζωα 1 και 4 θολή εικόνα με εντύπωση συσσωμάτων στις κατώτερες ώρες, για τα πειραματόζωα 2 και 5 διαυγέστερη εικόνα με πολύ ήπια θόλωση υαλώδους και εντύπωση διάλυσης των λιποσωμάτων. Τέλος, για τα πειραματόζωα 3 και 6 η βυθοσκόπηση έδειξε στους ΔΟ θολή εικόνα, ενώ στους ΑΟ διαυγή εικόνα χωρίς προσμίξεις.

Δεν παρατηρήθηκαν επιπλοκές σε κανένα από τους οφθαλμούς που ενέθηκαν (πχ ενδοφθαλμίτιδα).

*Συμπέρασμα:* Στην υαλοειδική κοιλότητα εμφανίζουν καλύτερη συμπεριφορά τα μικρότερου μεγέθους λιποσώματα (διαλύονται ευκολότερα, δίνουν διαυγέστερη εικόνα στην παρακολούθηση) και ειδικότερα με λιπιδική σύσταση PC/PG/Chol.

<sup>i</sup> PC liposomes: φωσφατιδιλχολίνη (phosphatidylcholine), και PG: φωσφατι-δωλγλυκερόλη (phosphatidylglycerol).

Στη συνέχεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν λιποσώματα με αυτή τη λιπιδική σύσταση και μέγεθος (δηλαδή PC/PG/Chol [9:1:5]).

Επόμενο βήμα ήταν η ενδοϋαλοειδική εφαρμογή διαφόρων συγκεντρώσεων tPA σε λιποσώματα, στο πειραματικό μοντέλο θρόμβωσης αμφιβληστροειδικών αγγείων κουνελιού και η αξιολόγηση της πορείας της θρόμβωσης.

#### 2.2.4.2. Πείραμα φωτοθρόμβωσης με φθαλοκυανίνη και διοδικό laser 670, σε αμφιβληστροειδικά αγγεία κουνελιού και ενδοϋαλοειδική ένεση tPA σε λιποσώματα (διάφορες δόσεις)

*Σκοπός:* Το πείραμα αυτό είχε σκοπό να αξιολογήσει την δράση της ενδοϋαλοειδικής ένεσης διαφόρων δόσεων tPA σε λιποσώματα, σε οφθαλμούς κουνελιών που προηγουμένως είχαν θρομβωθεί τα αμφιβληστροειδικά τους αγγεία με φωτοδυναμική θεραπεία.

*Υλικά και Μέθοδος:* Στο πείραμα συμπεριλήφθησαν 12 πειραματόζωα βάρους 2800 – 3000 gr. Η μεθοδολογία του πειράματος ήταν ίδια με αυτή που περιγράφεται στο πείραμα 2.2.2.3. (αναισθησία-μυδρίαση-φθαλοκυανίνη-laser) και στους 2 οφθαλμούς κάθε πειραματόζωου. Σε κάθε πειραματόζωο, μετά από ακτινοβολία διάρκειας 3-3,5 λεπτών, αξιολογήθηκε η θρόμβωση των αμφιβληστροειδικών αγγείων με βυθοσκόπηση. Ακολούθησε άμεσα ενδοϋαλοειδική ένεση tPA σε λιποσώματα (δόσεις από 12,75 έως 66 μg tPA/0,1ml) στους δε οφθαλμούς των πειραματόζωων, ενώ οι αρ οφθαλμοί παρακολουθήθηκαν ως ομάδα ελέγχου.

Στο πειραματόζωο 12, στον οφθαλμό μελέτης (ΔΟ) πραγματοποιήθηκε επιπλέον φλουοροαγγειογραφία – φωτογραφία βυθού.

*Αποτελέσματα:* Τα ευρήματα του πειράματος παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 6 που ακολουθεί. Οι οφθαλμοί αξιολογήθηκαν (βυθοσκόπηση) αμέσως μετά την θρόμβωση, και 24 ώρες μετά την ενδοϋαλοειδική ένεση tPA σε λιποσώματα.

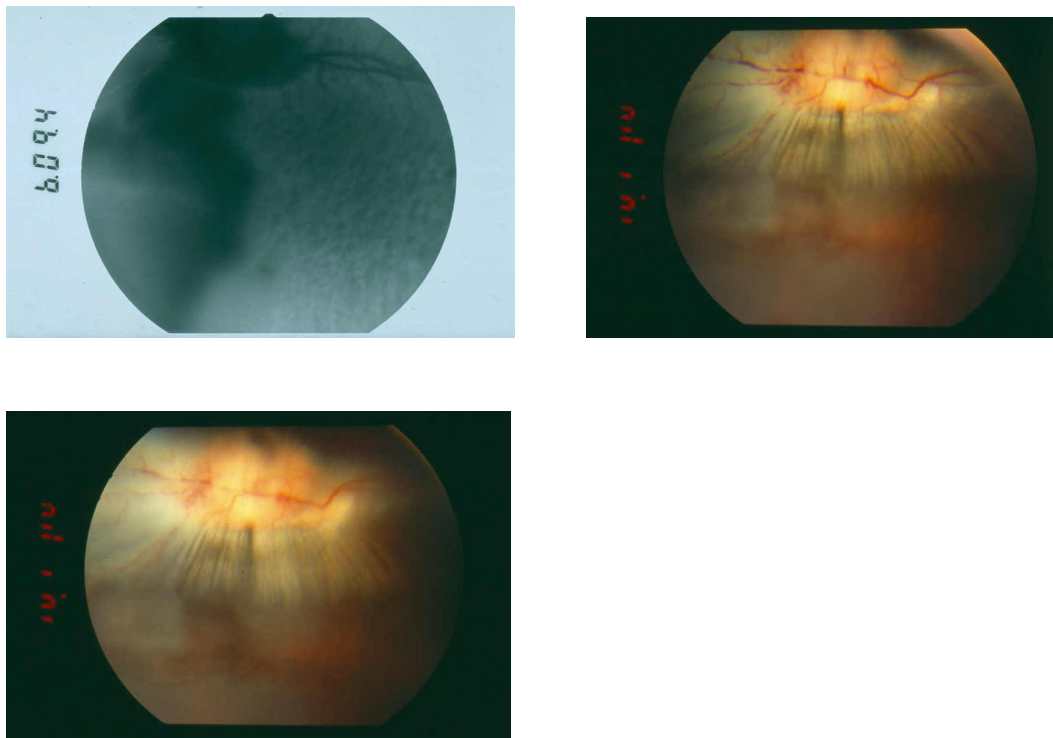


Πίνακας 6. Αποτελέσματα πειράματος 2.2.4.2

A/α		Θρόμβωση	Δόση tPA μg /0,1 ml	24 ώρες	Επιπλοκές- σχόλια
1	ΔΟ	+	12,75	+	
	ΑΟ	+	-	+	
2	ΔΟ	+	12,75		Αποκόλληση αμφιβλ/δούς
	ΑΟ	+	-	+	
3	ΔΟ	±	12,75	+	
	ΑΟ	±	-	-	
4	ΔΟ	±	12,75	-	
	ΑΟ	±	-	+	
5	ΔΟ	+	10,32	±	
	ΑΟ	+	-	+	
6	ΔΟ	+	10,32	±	
	ΑΟ	+	-	+	
7	ΔΟ	+	15,86	±	Ατελής αποκόλλ. υαλώδους
	ΑΟ	+	-	±	
8	ΔΟ	+	15,86	±	Ατελής αποκόλλ. Υαλώδους
	ΑΟ	+	-	±	
9	ΔΟ	+	7,9	±	Ατελής αποκόλλ. Υαλώδους
	ΑΟ	+	-	+	
10	ΔΟ	+	7,9	±	Ατελής αποκόλλ. Υαλώδους
	ΑΟ	+	-	+	
11	ΔΟ	+	66	-	
	ΑΟ	+	-	-	
12	ΔΟ	+	66	±	
	ΑΟ	+	-	+	

Αποτελέσματα πειράματος θρομβόλυσης με tPA σε λιποσώματα: A/α: ο αύξων αριθμός του πειραματόζωου, ΔΟ: δεξιός οφθαλμός (οφθαλμός μελέτης – ενέθηκε θρομβολυτικό), ΑΟ: αριστερός οφθαλμός (μάρτυρας – οφθαλμός ελέγχου χωρίς θεραπεία), Θρόμβωση: αξιολόγηση της απόφραξης των αγγείων με φωτοδυναμική θεραπεία πριν τις ενδοϋαλοειδικές ενέσεις (+ : πλήρης απόφραξη, θρόμβωση φλεβών, ± : ατελής θρόμβωση με κατακερματισμένη ροή ή μικροαιμορραγίες με διασταλμένες

φλέβες, - : απουσία θρόμβωσης – εικόνα σχεδόν φυσιολογική), 24 ώρες : τα ευρήματα της βυθοσκοπησης.



Εικόνα 16. Φωτογραφία βυθού και φλουροραγγειογραφία πειραματόζωου 12 (Δεξιός οφθαλμός). Διακρίνεται η διακοπή της ροής – κατακερματισμός αριστερά της οπτικής θηλής (φωτογραφία βυθού), ενώ η φλουροραγγειογραφία δείχνει πλήρη απόφραξη (6.09.4: όψιμες φάσεις φλουροραγγειογραφίας)

Σχόλια: Μια πρώτη ανάλυση των ευρημάτων (Πίνακας 6) δείχνει ότι οι 9 από τους 12 οφθαλμούς μελέτης εμφανίζουν μικρή ή μεγάλη βελτίωση της θρόμβωσης με τη θεραπεία, ένας οφθαλμός παραμένει αμετάβλητος και 2 επιδεινώνονται, ενώ από την ομάδα ελέγχου 4 οφθαλμοί βελτιώνονται, 7 παραμένουν αμετάβλητοι και ένας επιδεινώνεται. Αν δούμε όμως ποιοι οφθαλμοί εμφανίζουν αδιαμφισβήτητη βελτίωση (είχαν πλήρη απόφραξη πριν την ένεση θρομβολυτικού και βελτιώθηκαν σαφώς στις 24 ώρες με εικόνα ανοικτού – φυσιολογικού αγγείου), βλέπουμε ότι αυτό συνέβη μόνο στο πειραματόζωο 11 και για τους 2 οφθαλμούς!

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Στο πείραμα 4 στο πειραματικό μοντέλο φωτοδυναμικής θρόμβωσης αμφιβληστροειδικών αγγείων κουνελιού που περιγράψαμε στο πείραμα 2, χρησιμοποιήσαμε ενδοϋαλοειδικά λιποσωμιακό tPA σε διαφορετικές δόσεις (7,9 µg tPA/0,1ml έως 66 µg tPA/0,1ml). Στη συνέχεια παρακολουθήσαμε την πορεία της θρόμβωσης σε σχέση με τους μάρτυρες (έτερος οφθαλμός κάθε πειραματόζωου με θρόμβωση χωρίς θεραπεία) και διαπιστώσαμε ότι σε γενικές γραμμές δεν υπήρχε διαφορά ανάμεσα στις 2 ομάδες (12 οφθαλμοί με θεραπεία, 12 μάρτυρες).

Επόμενο βήμα ήταν να επαναλάβουμε παρόμοια σειρά πειραμάτων στο μοντέλο θρόμβωσης αμφιβληστροειδικών αγγείων και να χορηγήσουμε ενδοϋαλοειδικά τον θρομβολυτικό παράγοντα (tPA) και να συγκρίνουμε με ενδοϋαλοειδική ένεση tPA σε λιποσώματα (στο ίδιο πειραματικό μοντέλο).

### 2.2.5. ΠΕΙΡΑΜΑ 5

Το πείραμα αυτό περιλάμβανε φωτοδυναμική θρόμβωση με φθαλοκυανίνη και διοδικό laser 670 σε αμφιβληστροειδικά αγγεία κουνελιού και ενδοϋαλοειδική ένεση tPA σε λιποσώματα και σύγκριση με οφθαλμό που έλαβε tPA. Η αξιολόγηση των πειραματόζωων έγινε με βυθοσκόπηση και σε επιλεγμένες περιπτώσεις με OCT (οπτική τομογραφία συνοχής), ιστολογία και ανοσοϊστοχημεία.

2.2.5.1. Πείραμα φωτοθρόμβωσης με φθαλοκυανίνη και διοδικό laser 670, σε αμφιβληστροειδικά αγγεία κουνελιού και ενδοϋαλοειδική ένεση διαλύματος 10 – 15µg λιποσωμιακού tPA/0,10 ml και σύγκριση με οφθαλμούς που έλαβαν 50 - 70 µg tPA/0,10 ml

*Σκοπός:* Η αξιολόγηση της πορείας της θρόμβωσης μετά από ενδοϋαλοειδική ένεση διαλύματος λιποσωμάτων με 10 – 15µg tPA/0,10 ml και σύγκριση με οφθαλμούς που έλαβαν 50 – 70 µg tPA/0,10 ml, σε πειραματικό μοντέλο φωτοδυναμικής θρόμβωσης αμφιβληστροειδικών αγγείων κουνελιού, με φθαλοκυανίνη και διοδικό laser 670.

*Υλικό και Μέθοδος 1:* Στο πείραμα συμπεριλήφθησαν 2 πειραματόζωα βάρους 2950 και 3000 gr. Η μεθοδολογία του πειράματος ήταν ίδια με αυτή που περιγράφεται στο πείραμα 2.2.2.3. (αναισθησία-μυδρίαση-φθαλοκυανίνη-laser) και στους 2 οφθαλμούς κάθε πειραματόζωου.

Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως επιτυχής για θρόμβωση (μετά βυθοσκόπηση με Goldman) σε όλους τους οφθαλμούς σε χρόνο 3-3,5 λεπτά.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν ενδοϋαλοειδικές ενέσεις διαλύματος με 15 µg λιποσωμιακού tPA/0,1 ml στους Δε οφθαλμούς και των δύο πειραματόζωων, ενώ στους Αρ οφθαλμούς έγινε ενδοϋαλοειδική ένεση 50 µg tPA /0,10 ml, όπως περιγράφεται στην §1.2.2..

*Αποτελέσματα 1:* Ακολούθησε επανεξέταση σε 24 ώρες (υπό αναισθησία – μυδρίαση), όπου έδειξε και για τα δυο πειραματόζωα σε όλους τους οφθαλμούς παραμονή της θρόμβωσης των αγγείων, ενώ επιπλέον στους Αρ οφθαλμούς (ένεση 50 µg tPA) έδειξε περιοχική χοριοειδική αποκόλληση.

*Συμπέρασμα 1:* Η ενδοϋαλοειδική ένεση διαλύματος λιποσωμάτων με 15 µg tPA/0,10 ml σε σχέση με οφθαλμούς που έλαβαν 50 µg tPA/0,10 ml δεν εμφανίζει διαφορά στην πορεία αποκατάστασης της θρόμβωσης, σε αυτό το πειραματικό μοντέλο απόφραξης αμφιβληστροειδικών αγγείων κουνελιού.

Επόμενο βήμα ήταν η επανάληψη του πειράματος σε παρόμοιες δόσεις, σε περισσότερα πειραματόζωα για μεγαλύτερο χρόνο παρακολούθησης.

*Υλικό και Μέθοδος 2:* Στο πείραμα συμπεριλήφθησαν 8 πειραματόζωα βάρους 2850-3000 gr. Η μεθοδολογία του πειράματος ήταν ίδια με αυτή που περιγράφεται στο πείραμα 2.2.2.3. (αναισθησία-μυδρίαση-φθαλοκυανίνη-laser) και στους 2 οφθαλμούς κάθε πειραματόζωου (εκτός από τους Αρ οφθαλμούς των πειραματόζωων 6, 7 και 8, που δεν ακτινοβολήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως οφθαλμοί ελέγχου).

Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως επιτυχής για θρόμβωση (μετά βυθοσκόπηση με Goldman) σε όλους τους ακτινοβοληθέντες οφθαλμούς σε χρόνο 3 – 3,5 λεπτά.

Στη συνέχεια χορηγήθηκαν ενδοϋαλοειδικές ενέσεις διαλύματος 60-70 µg tPA/ 0,10 ml και στους δυο οφθαλμούς των πειραματόζωων 1 και 3, ενώ ενέσεις με 10 µg λιπιδωµακού tPA/0,1 ml έγιναν στους υπόλοιπους οφθαλμούς με θρόμβωση (Πίνακας 2) όπως περιγράφεται στην §1.2.2.: Το Πειραματικό Μοντέλο Θρόμβωσης. Οι Αρ οφθαλμοί των πειραματόζωων 6, 7 και 8 που δεν ακτινοβολήθηκαν, δεν ενέθηκαν με θρομβολυτικό παράγοντα και χρησιμοποιήθηκαν ως οφθαλμοί ελέγχου.

Στο τέλος της περιόδου παρακολούθησης τα πειραματόζωα 4, 5 (μόνο ο Αρ οφθαλμός) και 8 υπεβλήθησαν σε οπτική τομογραφία συνοχής για αξιολόγηση του πάχους αμφιβληστροειδούς.

Στη συνέχεια τα πειραματόζωα 4, 5 και 8 θυσιάστηκαν, οι οφθαλμοί εξορύχθηκαν και παρασκευάστηκαν ιστοτεμάχια για ιστολογικό έλεγχο.

#### *Αποτελέσματα 2:*

Όλοι οι οφθαλμοί εξετάστηκαν σε τακτά διαστήματα υπό αναισθησία – μυδρίαση: κανένας οφθαλμός που υπέστη θρόμβωση δεν έδειξε σημεία αποκατάστασης της ροής στα αποφραγμένα αγγεία (Πίνακας 7). Από τους 11 συνολικά οφθαλμούς που εφαρμόστηκε κάποια θεραπεία, οι 3 εμφάνισαν αποκόλληση αμφιβληστροειδούς στη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης. Στο τέλος της περιόδου παρακολούθησης οι οφθαλμοί που θρομβώθηκαν εμφάνισαν βιοµικροσκοπικά σηµεία αμφιβληστροειδικής και χοριοειδικής ισχαιμίας (ατροφία, τριχοειδική ερήμωση, διαταραχές χρωστικής).

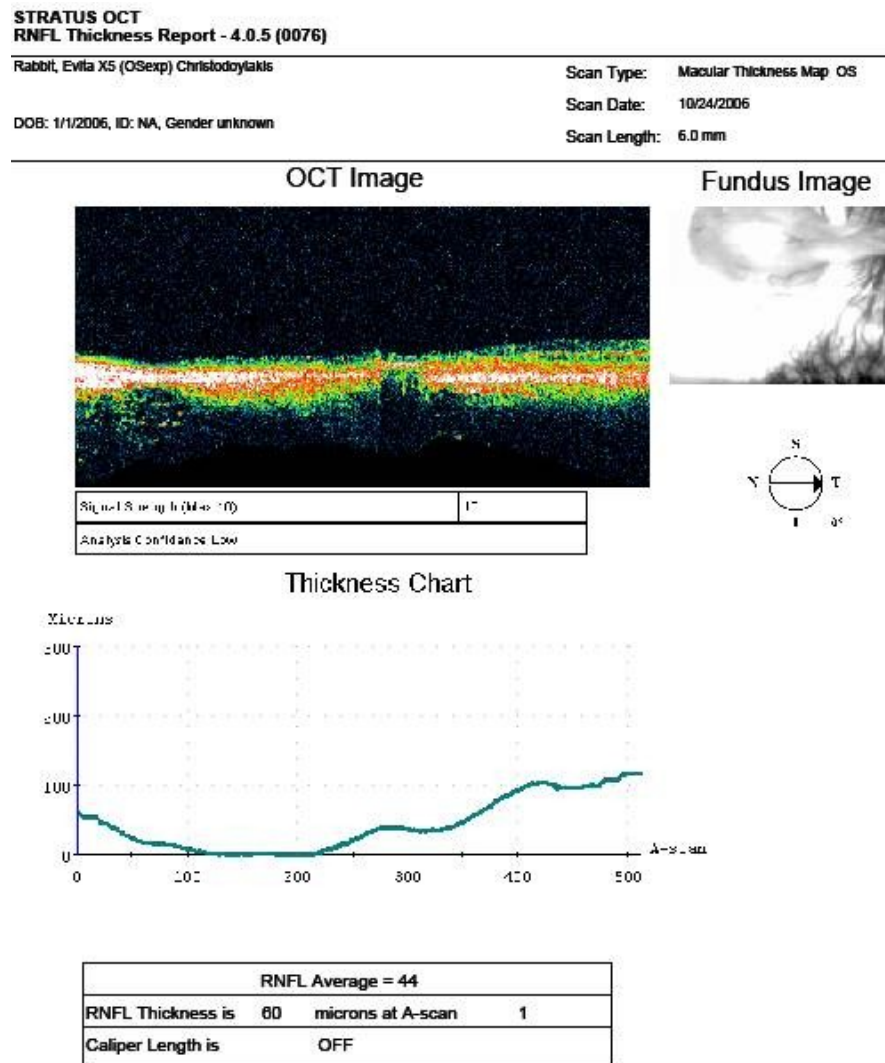
Πίνακας 7. Αποτελέσματα πειράματος 2.2.5.1. (μέθοδος 2)

A/α		Ένεση	22 d	33 d	5 m	7 m	10 m	15 m	Επιπλοκές- σχόλια
1	ΔΟ	tPA		+					
	ΑΟ	tPA		+					
2									Απεβίωσε στην αρχή του πειράματος
3	ΔΟ	tPA							Αποκόλληση αμφ/δούς
	ΑΟ	tPA		+					
4	ΔΟ	lip-tPA	++			++		+++	
	ΑΟ	lip-tPA	++			++		+++	Υπεξάρθρωση φακού
5	ΔΟ	lip-tPA							Αποκόλληση αμφ/δούς
	ΑΟ	lip-tPA	++			++		+++	
6	ΔΟ	lip-tPA	+						
	ΑΟ	-	-						
7	ΔΟ	lip-tPA							Αποκόλληση αμφ/δούς
	ΑΟ	-			-				
8	ΔΟ	lip-tPA			++		+++		
	ΑΟ	-			-		-		

Αποτελέσματα πειράματος θρομβόλυσης με tPA σε λιποσώματα – σύγκριση με tPA:

A/α: ο αύξων αριθμός του πειραματόζωου, ΔΟ: δεξιός οφθαλμός, ΑΟ: αριστερός οφθαλμός, Ένεση : όπου tPA: ενέθηκε 60-70 µg tPA σε 0,1 ml, όπου lip-tPA: ενέθηκε 10 µg tPA/0,1 ml διαλύματος λιποσωμάτων, 22d : 22<sup>η</sup> ημέρα παρακολούθησης, 5 m : 5<sup>ος</sup> μήνας παρακολούθησης της θρόμβωσης. Η θρόμβωση αξιολογήθηκε ως + : πλήρης απόφραξη, θρόμβωση φλεβών, ++ : πλήρης αγγειακή απόφραξη με τριχοειδική ερήμωση, +++ : επιπλέον χοριοειδική ατροφία με διαταραχή χρωστικής, - : απουσία θρόμβωσης με φυσιολογική εικόνα.

Αποτελέσματα OCT (οπτικής τομογραφίας συνοχής):



Εικόνα 17. Οπτική τομογραφία συνοχής Αρ οφθαλμού πειραματόζωου 5: (φωτοθρόμβωση και ενδοϋαλοειδική ένεση λιποσωμάτων με 10μg/tPA/0,10 ml). Εκδηλη αμφιβληστροειδική ατροφία, RNFL: 60 microns

**STRATUS OCT  
RNFL Thickness Report - 4.0.5 (0076)**

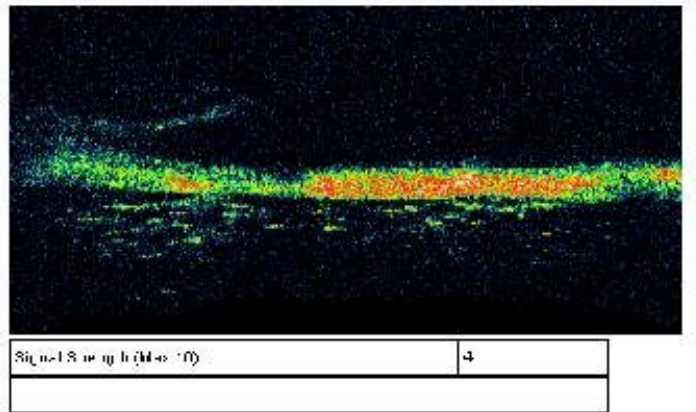
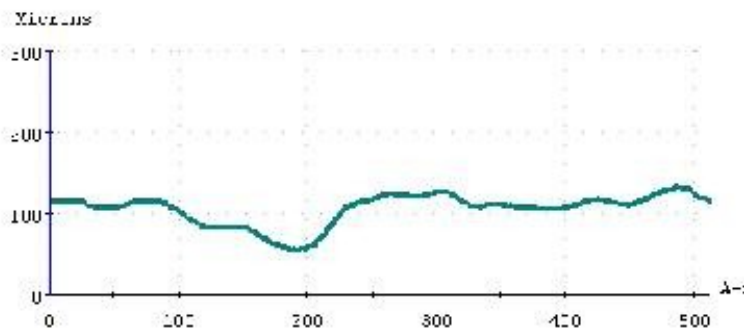
Rabbit, X41 Christodoylakis

Scan Type:

DOB: 1/1/2006, ID: NA, Gender unknown

Scan Date:

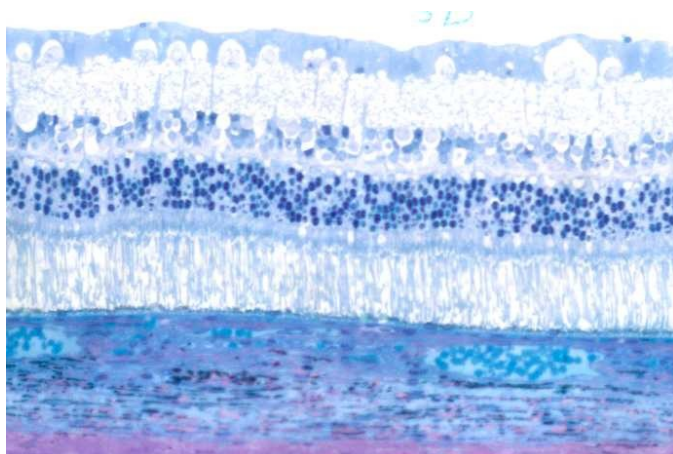
Scan Length:

**OCT Image**

**Thickness Chart**


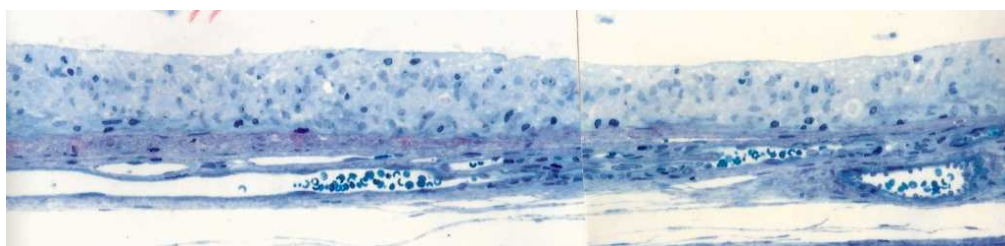
Εικόνα 18. Οπτική τομογραφία συνοχής Αρ οφθαλμού πειραματόζωου 8: (οφθαλμός ελέγχου, χωρίς θρόμβωση, δεν υποβλήθηκε σε καμία θεραπεία και δεν έχει θρομβωμένα αγγεία). RNFL: 115 microns



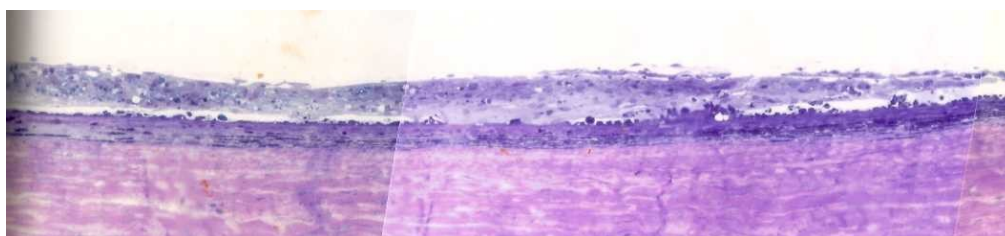
## Αποτελέσματα – Ιστολογία



Εικόνα 19. Φωτονική μικροσκοπία: Αρ οφθαλμός πειραματόζωου 8: διακρίνεται φυσιολογικός αμφιβληστροειδής κουνελιού



Εικόνα 20. Φωτονική μικροσκοπία: Δε οφθαλμός πειραματόζωου 8: διακρίνεται ατροφία αμφιβληστροειδή με απουσία επιφανειακών αμφιβληστροειδικών αγγείων: όλες οι στιβάδες είναι επίπεδες, εκδηλώνουν ομοιομορφία με σύμπτυξη αμφ/κών στιβάδων και σχεδόν πλήρης αντικατάσταση από κύτταρα συνδετικού ιστού. Ανάγγειος επιφάνεια. Δυσδιάκριτες κυτταρικές στιβάδες. Διαταραχή και της χοριοειδικής κυκλοφορίας με πάχυνση τοιχώματος των αγγείων



Εικόνα 21. Φωτονική μικροσκοπία: Αρ οφθαλμός πειραματόζωου 5: διακρίνεται ατροφία αμφιβληστροειδή με απουσία επιφανειακών αμφιβληστροειδικών αγγείων (ισχαιμία): όλες οι στιβάδες είναι επίπεδες, εκδηλώνουν ομοιομορφία με σύμπτυξη

αμφ/κών στιβάδων. Δυσδιάκριτες κυτταρικές στιβάδες. Εικόνα παρόμοια με παραπάνω

*Συμπέρασμα:* Η δόση 10 µg tPA /0,1 ml διαλύματος λιποσωμάτων, αλλά και 60-70 µg tPA /0,1 ml σε ενδοϋαλοειδική ένεση, δεν βελτιώνει την πορεία της θρόμβωσης σε μεγάλο χρόνο παρακολούθησης (33 μέρες μέχρι 15 μήνες). Η βιομικροσκοπική εικόνα ισχαιμίας από απόφραξη αμφιβληστροειδικών και χοριοειδικών αγγείων, τεκμηριώνεται και με οπτική τομογραφία συνοχής, αλλά και με ιστολογία.

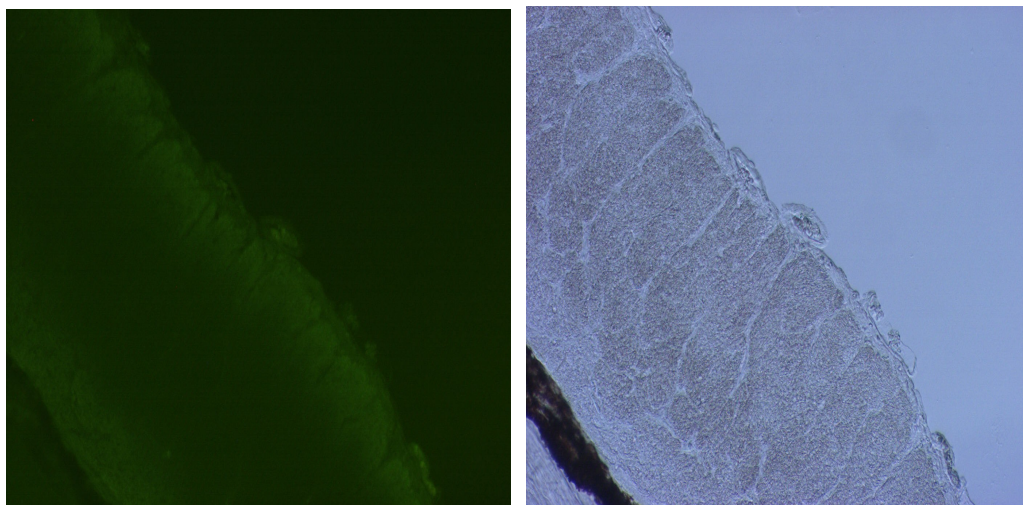
Στο επόμενο βήμα, μετά από αυτή την ένδειξη πως το tPA σε λιποσώματα δεν αλλάζει τη φυσική πορεία της νόσου, ελέγξαμε με ανοσοϊστοχημεία την ικανότητα του tPA σε λιποσώματα να περνά τον αιματοαμφιβληστροειδικό φραγμό (μετά ενδοϋαλοειδική ένεση), και να αναγνωρίζεται στον αυλό του αγγείου στόχου.

#### 2.2.5.2. Πείραμα ενδοϋαλοειδικής ένεσης tPA σε λιποσώματα – διερεύνησης με ανοσοϊστοχημεία

*Σκοπός:* Το πείραμα αυτό σχεδιάστηκε για να ελέγξει με ανοσοϊστοχημεία την ικανότητα του tPA σε λιποσώματα να περνά τον αιματοαμφιβληστροειδικό φραγμό (μετά ενδοϋαλοειδική ένεση) και να αναγνωρίζεται στον αυλό των αμφιβληστροειδικών αγγείων.

*Υλικό και Μέθοδος:* Στο πείραμα συμπεριλήφθησαν 2 πειραματόζωα βάρους 2850 και 3000 gr (υπ' αριθμό X1 και X2). Μετά από υποδόρια αναισθησία – μυδρίαση, ακολούθησε ενδοϋαλοειδική ένεση 12,9 µg tPA/ 0,1 ml διαλύματος λιποσωμάτων στους ΔΟ (όπως περιγράφεται στην §1.2.2.), ενώ ο ΑΟ χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας.

Μετά 24 ώρες: θανάτωση πειραματόζωων. Οι οφθαλμοί εξορύχτηκαν και παρασκευάστηκαν δείγματα (ιστοτεμάχια) X1 ΑΟ, X1 ΔΟ, X2 ΑΟ και X2 ΔΟ και μονιμοποιήθηκαν σε φορμαλίνη 10% σε TBS (προετοιμασία για ανοσοϊστοχημεία, §1.2.6.2.).

*Αποτελέσματα - Ανοσοϊστοχημεία*

Εικόνα 22. Φωτογραφία ανοσοφθορισμού και περοξειδάσης, δείγματος X1 ΔΟ, μετά ενδοϋαλοειδική ένεση 12,9 μg tPA/ 0,1 ml διαλύματος λιποσωμάτων

*Σχόλιο – Συμπέρασμα:* Η ανοσοϊστοχημεία δεν κατόρθωσε να δείξει ανοσοφθορισμό από tPA εντός του αμφιβληστροειδή ή εντός των αμφιβληστροειδικών αγγείων, μετά από ενδοϋαλοειδική ένεση 12,9 μg tPA/ 0,1 ml διαλύματος λιποσωμάτων.

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ**

Στο πείραμα 5 στο πειραματικό μοντέλο φωτοδυναμικής θρόμβωσης αμφιβληστροειδικών αγγείων κουνελιού που περιγράψαμε στο πείραμα 2, χρησιμοποιήσαμε ενδοϋαλοειδικά λιποσωματικά tPA σε διαφορετικές δόσεις (10 - 15 μg tPA /0,1 ml δλ λιποσώματα), αλλά και 50 – 70 μg tPA /0,1 ml διαλύματος σε ενδοϋαλοειδική ένεση και δείξαμε ότι καμία από τις παραπάνω θεραπείες δεν βελτιώνει την πορεία της θρόμβωσης σε μεγάλο χρόνο παρακολούθησης (μέχρι 14 μήνες). Στη συνέχεια ελέγξαμε με ανοσοϊστοχημεία την ικανότητα του tPA σε λιποσώματα να διαπερνά τον αιματοαμφιβληστροειδικό φραγμό και δείξαμε ότι μετά από ενδοϋαλοειδική ένεση 12,9 μg tPA/ 0,1 ml διαλύματος λιποσωμάτων, το tPA δεν αναγνωρίζεται ενδοαγγειακά ή ενδοαμφιβληστροειδικά.

Στο επόμενο βήμα προσπαθήσαμε να αυξήσουμε τη διαπερατότητα των αμφιβληστροειδικών αγγείων με ενδοϋαλοειδική χορήγηση VEGF (αγγειακού αυξητικού ενδοθηλιακού παράγοντα), επαναλαμβάνοντας παρόμοια σειρά πειραμάτων στο μοντέλο θρόμβωσης αμφιβληστροειδικών αγγείων, και γι' αυτό χορηγήσαμε ενδοϋαλοειδικά tPA και tPA σε λιποσώματα και ελέγξαμε με ανοσοϊστοχημεία - και κλινικά, την πορεία της θρόμβωσης.

### **2.2.6. ΠΕΙΡΑΜΑ 6**

Στο πείραμα αυτό ελέγξαμε την ενδοϋαλοειδική χορήγηση VEGF σε κουνέλια και στη συνέχεια, στο μοντέλο θρόμβωσης που έχουμε αναπτύξει, χορηγήσαμε ενδοϋαλοειδικά VEGF πριν από την χορήγηση των θρομβολυτικών παραγόντων.

#### 2.2.6.1. Πείραμα ελέγχου ενδοϋαλοειδικής χορήγησης VEGF σε κουνέλια

*Σκοπός:* η αξιολόγηση της δράσης του VEGF 165 (§1.2.7), σε ενδοϋαλοειδική ένεση σε οφθαλμό κουνελιού.

*Υλικό και Μέθοδος:* Στο πείραμα συμπεριλήφθησαν 3 πειραματόζωα βάρους 2800 και 3000 gr. Μετά από υποδόρια αναισθησία – μυδρίαση, στα πειραματόζωα 1 και 2 ακολούθησε ενδοϋαλοειδική ένεση 50 – 80  $\mu$ L (8 ng VEGF) ενδοϋαλοειδικά και στους δύο οφθαλμούς. Στο πειραματόζωο 3 ενέθηκαν 50 – 80  $\mu$ L BSS ενδοϋαλοειδικά άμφω.

*Αποτελέσματα:* Ο έλεγχος στα 30 λεπτά (βυθοσκόπηση) έδειξε έντονη αγγειοδιαστολή των αμφιβληστροειδικών αγγείων – και του οπτικού νεύρου σε όλους τους οφθαλμούς με VEGF, ενώ δεν έδειξε κανένα εύρημα στους οφθαλμούς που έλαβαν BSS.

Η επανεξέταση σε 16 ώρες υπό αναισθησία – μυδρίαση έδειξε πλήρη υποχώρηση του φαινομένου.

Επόμενο βήμα ήταν η χορήγηση VEGF πριν την ένεση θρομβολυτικών παραγόντων, με σκοπό να αυξήσουμε την διαπερατότητα των φαρμάκων ενδοαμφιβληστροειδικά.

#### 2.2.6.2. Πείραμα ελέγχου παρουσίας tPA στα αμφιβληστροειδικά αγγεία μετά ενδοϋαλοειδική χορήγηση (ανοσοϊστοχημεία)

*Σκοπός:* Ο έλεγχος με ανοσοϊστοχημεία του tPA, με / χωρίς λιποσώματα, με / χωρίς VEGF να διαπερνά τους οφθαλμικούς ιστούς μετά ενδοϋαλοειδική ένεση και να αναγνωρίζεται ενδοαγγειακά.

*Υλικό και Μέθοδος:* Στο πείραμα συμπεριλήφθησαν 5 πειραματόζωα μέσου βάρους 3000 gr. Μετά από υποδόρια αναισθησία – μυδρίαση ακολούθησαν ενδοϋαλοειδικές ενέσεις όπως περιγράφεται παρακάτω:

πειραματόζωο 1: οφθαλμοί – δείγματα 1 (OS) και 2 (OD). Δεν ενέθηκε κανένα φάρμακο.

πειραματόζωο 2: οφθαλμοί – δείγματα 3 (OS) και 11 (OD). 60μg t-PA/60 μl water for injection, ενέθηκε στους 2 οφθαλμούς

πειραματόζωο 3: οφθαλμοί – δείγματα 5 (OS) και 6 (OD). 60 μg λιποσωματικό t-PA σε 80 μl BSS ενέθηκε στους 2 οφθαλμούς

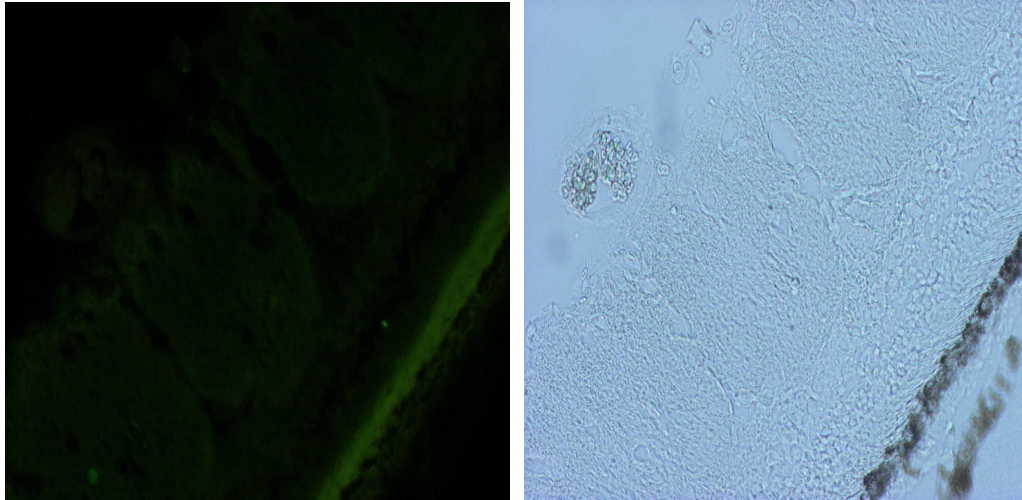
πειραματόζωο 4: οφθαλμοί – δείγματα 7 (OS) και 8 (OD). 6 ng VEGF 165 σε 60 μl BSS και 5 λεπτά αργότερα 60 μg λιποσωματικό t-PA σε 80 μl BSS ενέθηκε στους 2 οφθαλμούς,

πειραματόζωο 5: οφθαλμοί – δείγματα 9 (OS) και 10 (OD). 6 ng VEGF 165 σε 6 μg BSS και 5 λεπτά αργότερα 60 μg t-PA σε 80 μl BSS ενέθηκε στους 2 οφθαλμούς.

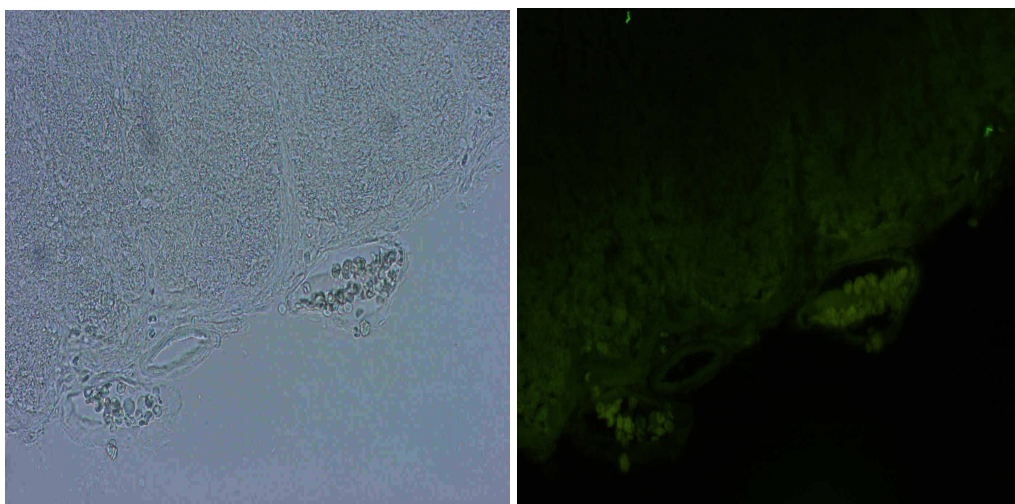
Όλα τα πειραματόζωα 18 ώρες αργότερα θυσιάστηκαν, οι οφθαλμοί εξορύχθησαν, και παρασκευάστηκαν – μονιμοποιήθηκαν σε φορμαλίνη (προετοιμασία για ανοσοϊστοχημεία).

*Αποτελέσματα – Ανοσοϊστοχημεία:*

Με ανοσοϊστοχημεία αξιολογήθηκε η διαπερατότητα λιποσωμάτων – tPA: περιγράφονται παρακάτω τα δείγματα 3OS, 5OS, 7OS. Η ανοσοϊστοχημεία έδειξε ότι στα αμφιβληστροειδικά αγγεία (κάτω από την έσω αφοριστική) δεν παρατηρείται φθορισμός ενδοαγγειακά, ενδεικτικός για παρουσία tPA. Επίσης έδειξε ότι η διαταραχή του φραγμού που προκαλεί το VEGF δεν είναι αρκετή ώστε να διαπεράσει το tPA (με/χωρίς λιποσώματα) το αγγειακό τοίχωμα.



Εικόνα 23. Φωτογραφία ανοσοφθορισμού και περοξειδάσης του δείγματος 3 (οφθαλμικός ιστός κουνελιού, 18 ώρες μετά από ενδοϋαλοειδική ένεση 60 µg t-PA/80 µl BSS): δεν παρατηρείται φθορισμός στα αγγεία κάτωθεν της έσω αφοριστικής



Εικόνα 24. Φωτογραφία περοξειδάσης και ανοσοφθορισμού του δείγματος 7 OS (οφθαλμικός ιστός κουνελιού, 18 ώρες μετά από ενδοϋαλοειδική ένεση 6 ng VEGF

165 σε 6 µg BSS και 5 λεπτά αργότερα λιποσωµιακό t-PA 60 µg /80 µl BSS . Δεν παρατηρείται φθορισµός στα αγγεία κάτωθεν της έσω αφοριστικής.

*Συμπέρασμα:* Σε πειραµατικό µοντέλο οφθαλµού κονίκλου, το tPA αν ενεθεί ενδοϋαλοειδικά (60 µg t-PA/60 µl, 60 µg λιποσωµιακό t-PA/80 µl δλ, 6 ng VEGF 165/6 µg BSS και 5 λεπτά αργότερα 60 µg λιποσωµιακό t-PA/80 µl BSS) δεν διαπερνά το αγγειακό τοίχωµα των αµφιβληστροειδικών αγγείων και δεν εντοπίζεται ενδοαγγειακά.

### 2.2.6.3. Πείραµα φωτοθρόµβωσης µε φθαλοκυανίνη και διοδικό laser 670, σε αµφιβληστροειδικά αγγεία κουνελιού και χορήγησης VEGF µε tPA ενδοϋαλοειδικά

*Σκοπός:* Το πείραµα αυτό στόχευε στην αξιολόγηση της κλινικής πορείας της θρόµβωσης αµφιβληστροειδικών αγγείων µετά από ενδοϋαλοειδική ένεση VEGF αρχικά και tPA στη συνέχεια.

*Υλικό – Μέθοδος:* Στο πείραµα συµπεριλήφθησαν 5 πειραµατόζωα βάρους 2850 – 3000 gr. Η µεθοδολογία του πειράµατος ήταν ίδια µε αυτή που περιγράφεται στο πείραµα 2.2.2.3. (αναισθησία-µυδρίαση-φθαλοκυανίνη-laser) στους Δε οφθαλµούς κάθε πειραµατόζωου (οι Αρ οφθαλµοί των πειραµατόζωων δεν ακτινοβολήθηκαν και δεν έγιναν ενδοϋαλοειδικές ενέσεις και χρησιµοποιήθηκαν ως οφθαλµοί ελέγχου). Η µέθοδος αξιολογήθηκε ως επιτυχής για θρόµβωση (µετά βυθοσκόπηση µε Goldman) σε όλους τους ακτινοβοληθέντες οφθαλµούς, σε χρόνο 3 – 3,5 λεπτά.

Την επόµενη µέρα, υπό αναισθησία – μυδρίαση, ελέχθησαν οι Δε οφθαλµοί των πειραµατόζωων και διαπιστώθηκε θρόµβωση σε όλους. Στη συνέχεια τα πειραµατόζωα 4 και 5 (τα πειραµατόζωα 2 και 3 είχαν απεβιώσει κατά την διάρκεια της αναισθησίας την 2<sup>η</sup> µέρα), υπεβλήθησαν σε ενδοϋαλοειδική ένεση 100ng VEGF 165/0,1 ml και 10 λεπτά µετά 60-70 µg tPA/ 0,07 ml διαλύµατος ενδοϋαλοειδικά. Στο πειραµατόζωο 1 (Δε οφθαλµός) δεν ενέθηκε καµία ουσία.

*Αποτελέσματα:* Τα αποτελέσµατα περιγράφονται αναλυτικά στον Πίνακα 8. Είναι αξιοσηµείωτο ότι **κανένας οφθαλµός δεν βελτίωσε την κλινική πορεία της**

**θρόμβωσης**, και το πειραματόζωο 5 (ΔΟ) που έλαβε VEGF με tPA, παρ' ότι αρχικά έδειξε ατελή θρόμβωση με αγγειοδιαστολή (βελτίωση), στην πορεία εγκαταστήθηκε πλήρης αγγειακή απόφραξη. Επίσης το πειραματόζωο 1 (Δε οφθαλμός) που δεν χορηγήθηκε θρομβολυτικό ή VEGF, εμφάνισε μετά την θρόμβωση εντοπισμένη χοριοειδική αποκόλληση στην περιοχή της ακτινοβόλησης, που υπέστρεψε αυτόματα μετά την 5<sup>η</sup> ημέρα παρακολούθησης.

Πίνακας 8. Αποτελέσματα πειράματος 2.2.6.3.

A/α		Ένεση	4 d	8 d	15d	21 d	47 d	Επιπλοκές- Σχόλια
1	ΔΟ	-	+	+	+	+	+	Εντοπισμένη χοριοειδική αποκόλληση
2								Απεβίωσε στην αρχή του πειράματος
3								Απεβίωσε στην αρχή του πειράματος
4	ΔΟ	VEGF-tPA	+	+	+	+	+	
5	ΔΟ	VEGF-tPA	±	±	+	+	+	

Αποτελέσματα πειράματος θρομβόλυσης με VEGF και tPA – σύγκριση με tPA:

A/α: ο αύξων αριθμός του πειραματόζωου, ΔΟ: δεξιός οφθαλμός, Ένεση : όπου VEGF-tPA: ενέθηκε 100ng VEGF 165/0,1 ml και 10 λεπτά μετά 60 – 70 μg tPA/ 0,07 ml διαλύματος ενδοϋαλοειδικά, όπου - : δεν χορηγήθηκε καμία ένεση. 4d : 4<sup>η</sup> ημέρα παρακολούθησης. Η θρόμβωση αξιολογήθηκε ως + : πλήρης απόφραξη με φλεβική θρόμβωση και ± : ατελής αγγειακή απόφραξη με αγγειοδιαστολή στην περιοχή της θρόμβωσης και περιφερικά.

Συμπέρασμα: Η δόση 100ng VEGF 165/0,1 ml και 10 λεπτά μετά 60-70 μg tPA/ 0,07 ml διαλύματος σε ενδοϋαλοειδική ένεση, δεν βελτιώνει την πορεία της θρόμβωσης (2 οφθαλμοί) σε σχέση με οφθαλμό που δεν έλαβε θεραπεία.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Στο πείραμα 6 στο πειραματικό μοντέλο φωτοδυναμικής θρόμβωσης αμφιβληστροειδικών αγγείων κουνελιού που περιγράψαμε στο πείραμα 2, χορηγήσαμε ενδοϋαλοειδικά VEGF σε δόσεις 100ng VEGF 165/0,1 ml, και 10 λεπτά μετά 60 – 70 μg tPA/ 0,07 ml με ενδοϋαλοειδική ένεση, και δείξαμε ότι δεν βελτιώνεται η πορεία της θρόμβωσης σε χρόνο παρακολούθησης μέχρι 47 μέρες. Στη



συνέχεια δείξαμε με ανοσοϊστοχημεία ότι το tPA δεν διαπερνά τον αιματοαμφιβληστροειδικό φραγμό, είτε μόνο του είτε σε τροποποιημένη μορφή (λιποσώματα), ακόμα κι αν διαταράξουμε τον αιματοαμφιβληστροειδικό φραγμό (VEGF).

## 2.2.7. ΣΥΝΟΨΗ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

**Συνοψίζοντας**, στην πειραματική σειρά δείξαμε:

1. ότι στο ωτιαίο μοντέλο θρόμβωσης που αναπτύξαμε (πείραμα 1), η χορήγηση διαφόρων δόσεων tPA υποδόρια (10, 50, 100 µg/0,1 ml) δεν είναι σε θέση να λύσει την απόφραξη των θρομβωμένων φλεβών· επιπλέον ελέγξαμε με ανοσοϊστοχημεία την ικανότητα του tPA σε λιποσώματα, αν ενεθεί εξωαγγειακά (υποδόρια), να αποκτήσει πρόσβαση στον αυλό του αγγείου και δείξαμε ότι το tPA, **δεν** αναγνωρίζεται στον αυλό του αγγείου, όταν ενεθεί εξωαγγειακά,
2. στο πειραματικό μοντέλο φωτοδυναμικής θρόμβωσης αμφιβληστροειδικών αγγείων κουνελιού που αναπτύξαμε στο πείραμα 2, χρησιμοποιήσαμε ενδοϋαλοειδικά tPA σε τρεις διαφορετικές δόσεις (15µg/0,1ml, 50µg/0,1ml, 100µg/0,1ml) και στη συνέχεια παρακολούθησαμε την πορεία της θρόμβωσης σε σχέση με τους μάρτυρες (έτερος οφθαλμός κάθε πειραματόζωου, όπου ενέθηκε BSS) και διαπιστώσαμε ότι δεν υπάρχει διαφορά ανάμεσα στις δυο ομάδες: για 24 – 72 ώρες όλοι οι οφθαλμοί διατηρούν τη θρόμβωση όπως αυτή προκλήθηκε στην αρχή του πειράματος. Στις πρώτες πειραματικές σειρές θεωρήσαμε ότι ο χρόνος παρακολούθησης 24 – 72 ωρών μετά τη θεραπεία, θα ήταν αρκετός γιατί: το tPA έχει καλύτερη αποτελεσματικότητα σε πρόσφατο θρόμβο και γιατί η αποτελεσματικότητά του εξασθενεί με το χρόνο, επομένως πιθανή λύση του θρόμβου όφειλε να έχει αναδειχθεί σε αυτό το χρονικό διάστημα,
3. έχοντας ήδη ενδείξεις ότι το tPA μόνο του δεν αλλάζει την φυσική πορεία της θρόμβωσης αναπτύξαμε (σε συνεργασία με την ερευνητική ομάδα του Παν. Πάτρας) tPA εγκλωβισμένο σε λιποσώματα, όπου δείχθηκε η σταθερότητά

του και η διατήρηση της αμιδολυτικής του δράσης<sup>90</sup> (Παράρτημα 1 και 2). Εφαρμόσαμε ενδοϋαλοειδικά το λιποσωμιακό tPA σε διαφορετικές δόσεις (7,9 µg tPA/0,1ml έως 66 µg tPA/0,1ml) στο οφθαλμικό μοντέλο θρόμβωσης, στη συνέχεια παρακολουθήσαμε την πορεία της θρόμβωσης σε σχέση με τους μάρτυρες (έτερος οφθαλμός κάθε πειραματόζωου, με θρόμβωση χωρίς θεραπεία) και διαπιστώσαμε ότι σε γενικές γραμμές δεν υπήρχε διαφορά ανάμεσα στις 2 ομάδες (12 οφθαλμοί με θεραπεία, 12 μάρτυρες),

4. η συγκριτική σειρά θεραπειών στο προαναφερθέν μοντέλο οφθαλμικής θρόμβωσης (ενδοϋαλοειδική ένεση λιποσωμιακού tPA σε διαφορετικές δόσεις [10 - 15 µg tPA /0,1 ml δλ λιποσώματα], αλλά και 60 – 70 µg tPA /0,1 ml δλ), έδειξε ότι καμία από τις παραπάνω θεραπείες δεν βελτιώνει την πορεία της θρόμβωσης σε μεγάλο χρόνο παρακολούθησης (μέχρι 14 μήνες),
5. η αδυναμία της θεραπείας με ενδοϋαλοειδική ένεση θρομβολυτικού να βελτιώσει την πορεία της πειραματικής θρόμβωσης, εξηγήθηκε από τα πειράματα της ανοσοϊστοχημείας, όπου
  - δεν κατόρθωσε να δείξει ανοσοφθορισμό από tPA, εντός του αμφιβληστροειδή ή εντός των αμφιβληστροειδικών αγγείων, μετά από ενδοϋαλοειδική ένεση 12,9 µg tPA/ 0,1 ml διαλύματος λιποσωμάτων (πείραμα 5)
  - το tPA αν ενεθεί ενδοϋαλοειδικά (60 µg t-PA/60 µl, 60 µg λιποσωμιακό t-PA/80 µl δλ, 6 ng VEGF 165/6 µg BSS και 5 λεπτά αργότερα 60 µg λιποσωμιακό t-PA/80 µl BSS) δεν διαπερνά το αγγειακό τοίχωμα των αμφιβληστροειδικών αγγείων και δεν κατορθώνει να αναγνωριστεί ενδοαγγειακά (πείραμα 6).

Ενδιαφέρον είναι ότι ο ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου δεν ανευρίσκεται ενδοαγγειακά, ακόμα κι αν διαταράξουμε τον αιματο-αμφιβληστροειδικό φραγμό με VEGF, που σημαίνει ότι εμπλέκονται κι άλλοι παράγοντες εκτός του αγγειακού φραγμού (έσω αφοριστική μεμβράνη, απενεργοποίηση φαρμάκου κλπ). Ο ρόλος της έσω αφοριστικής μεμβράνης και η πιθανή λειτουργία της ως φραγμού έχει συζητηθεί τα τελευταία έτη.=

Η ικανότητα διάχυσης του tPA μέσω του αμφιβληστροειδή προς τον υπαμφιβληστροειδικό χώρο είναι αμφίβολη,<sup>101, 102</sup> ενώ η διακίνηση φαρμάκου στον

αμφιβληστροειδή μέσω του υαλώδους, αποτελεί πρόκληση λόγω των φραγμών του νευροαισθητήριου αμφιβληστροειδή. Η έσω και έξω αφοριστική μεμβράνη είναι πλούσιες σε γλυκοζαμινογλυκάνες, έχουν ιδιότητες φραγμού διάχυσης<sup>103, 104</sup> και έχει υποτεθεί ότι το μοριακό βάρος, η διάμετρος και ακόμα περισσότερο το φορτίο των μορίων που εισέρχονται στο υαλώδες επηρεάζουν την ικανότητα να διακινούνται μέσω μεμβρανών.<sup>105, 106</sup> Η έσω και η έξω δικτυωτή στιβάδα επίσης ασκούν περιοριστική δράση στη διακίνηση των μορίων στον αμφιβληστροειδικό χώρο.<sup>107</sup> Οι Kamei et al<sup>95</sup> έδειξαν επίσης σε πειραματικό μοντέλο κονίκλου, ότι το tPA δεν μπορεί να διαχυθεί στον υπαμφιβληστροειδικό χώρο μετά ενδοϋαλοειδική ένεση. Η πληροφορία πως η αλβουμίνη με μοριακό βάρος 68 kDa, παρόμοιο του tPA, μπορεί να φτάσει τον υπαμφιβληστροειδικό χώρο σε πειραματικό μοντέλο,<sup>108</sup> δεικνύει ότι εκτός του μοριακού βάρους εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες στη διακίνηση του φαρμάκου.

Στην πειραματική σειρά που διενεργήσαμε, αντιλαμβανόμενοι νωρίς σχετικά αυτήν ακριβώς την αδυναμία του tPA να διαπεράσει τους οφθαλμικούς φραγμούς, προσπαθήσαμε να την υπερβούμε:

1. τροποποιώντας το φάρμακο και χορηγώντας το εγκλωβισμένο σε λιποσώματα που αποδεδειγμένα εμφανίζουν καλύτερη διαπερατότητα, αλλά και εξασφαλίζουν μεγαλύτερη παραμονή σε ενεργό μορφή του δραστικού παράγοντα. Αυτό δεν ήταν αρκετό για την υπέρβαση του φραγμού (ανοσοϊστοχημεία) και κατά συνέπεια για τη βελτίωση της πορείας της θρόμβωσης στο πειραματικό μοντέλο που αναπτύξαμε.
2. διαταράσσοντας φαρμακευτικά τον αιματοαμφιβληστροειδικό φραγμό και αυξάνοντας τη διαπερατότητα των αμφιβληστροειδικών αγγείων με χρήση VEGF, πριν την χορήγηση του tPA· ούτε μ' αυτόν τον τρόπο κατέστη δυνατό για το tPA να αναγνωριστεί ενδοαγγειακά και ακόμα περισσότερο, να αλλάξει την πορεία της θρόμβωσης.

## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Η θρόμβωση της φλέβας του αμφιβληστροειδή είναι ένα δυσεπίλυτο πρόβλημα για τη σύγχρονη ιατρική, ενώ η λύση του θρόμβου και η αποκατάσταση της αμφιβληστροειδικής κυκλοφορίας παραμένει μια πρόκληση της εποχής. Η υπάρχουσα εμπειρία από άλλες ιατρικές ειδικότητες (πχ καρδιολογία) και οι αρχικά ελπιδοφόρες δημοσιεύσεις στην οφθαλμολογία, μας ώθησαν να στρέψουμε τις ερευνητικές μας προσπάθειες στην εφαρμογή θρομβολυτικών ενδοϋαλοειδικά.

Η αρχική ιδέα, για βελτίωση της αποτελεσματικότητας του θρομβολυτικού παράγοντα με την προτεινόμενη τεχνική που εφαρμόσαμε στο κλινικό μέρος, δεν συνδυάστηκε με αντίστοιχα θετικά αποτελέσματα.<sup>94, 100</sup> Παρότι η μέθοδος δεν εφαρμόστηκε με χρονική υστέρηση από την έναρξη του θρομβωτικού επεισοδίου σε σχέση με τη βιβλιογραφία και την αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα του t-PA στην περιοχή της θρόμβωσης, η κλινική πορεία των ασθενών δεν βελτιώθηκε σε σχέση με την αναμενόμενη.<sup>42, 50, 93, 100</sup> Επιπρόσθετα επέτεινε τον προβληματισμό στη βιβλιογραφία, για την ικανότητα του φαρμάκου να διαχέεται καταρχάς ενδοαμφιβληστροειδικά και ενδοαγγειακά αφετέρου, μετά από ενδοϋαλοειδική χορήγηση.<sup>70, 95</sup>

Η παρασκευή άλλων μορίων (αμφοτερικίνη Β) σε λιποσωμική μορφή, επέτρεψε την χορήγηση υψηλότερων συγκεντρώσεων φαρμάκου στην υαλοειδική κοιλότητα, με μικρότερη τοξικότητα και υψηλότερη σταθερότητα και διάρκεια,<sup>109</sup> ενώ η πληροφορία ότι το t-PA σε λιποσώματα μπορεί να περάσει τον ανέπαφο αιματοεγκεφαλικό φραγμό,<sup>110</sup> έδωσε την ιδέα να το χορηγήσουμε ενδοϋαλοειδικά και να αναμένουμε την είσοδό του καταρχάς στον ενδο-αμφιβληστροειδικό χώρο και ενδοαγγειακά αφετέρου.

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας, η υπόθεση αυτή δεν επιβεβαιώθηκε· φάνηκε καθαρά ότι το tPA ενιέμενο εξωαγγειακά (μοντέλο αυτιού), ή ενδοϋαλοειδικά (οφθαλμικό μοντέλο), ακόμη και σε λιποσωμιακή μορφή, δε διαπερνά τους φραγμούς και δεν αναγνωρίζεται στον αυλό του αγγείου.<sup>111, 114, 115</sup> Εξηγείται μ' αυτόν τον τρόπο ότι, πιθανά αποτελεσματικές θεραπείες, έναντι της φυσικής πορείας της αγγειακής απόφραξης, είναι αυτές που αφορούν ενδοαγγειακή χορήγηση όπως η συστηματική θρομβόλυση στην καρδιολογία και στη σειρά ασθενών από Elmann et al<sup>39</sup>, ή απ' ευθείας καθετηριασμός οφθαλμικών αγγείων (οφθαλμική αρτηρία,<sup>43</sup> αμφιβληστροειδικά αγγεία<sup>42</sup>). Πιθανώς επίσης, ο αιματοαμφιβληστροειδικός φραγμός δεν επιτρέπει σε φάρμακα όπως ο ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου να εισέλθουν στο αγγείο· πολλοί ερευνητές

χρησιμοποιούν τεχνικές εφαρμογής θρομβολυτικού παράγοντα, που τροποποιούν οι ίδιες τον αιματοαμφιβληστροειδικό φραγμό όπως η ελυτροτομή από Garcia-Agumi et al,<sup>50</sup> ο καθετηριασμός από τους Weiss και Bynoe,<sup>42</sup> αλλά και Lam – Blumenkranz.<sup>93</sup>

Φυσικά πρέπει να αναγνωριστεί ότι δεν είναι δυνατή η απόλυτη προσομοίωση του ανθρώπινου οφθαλμολογικού μοντέλου, όπως και ότι χορηγήσαμε ένα ανασυνδυασμένο ανθρώπινο παράγοντα σε ένα πειραματικό μοντέλο – οφθαλμό κονίκλου που έχει επιπλέον πολλούς περιορισμούς,<sup>112</sup> όπως αυξημένο πάχος της έσω αφοριστικής μεμβράνης, διαφορετικού τύπου αγγείωση σε σχέση με πρωτεύοντα θηλαστικά, αλλά και την πιθανή ασυμβατότητα.

Νεότερα θρομβολυτικά φάρμακα όπως το tenecteplase πιθανώς να δείχνουν καλύτερη αποτελεσματικότητα από το tPA, εφόσον μέχρι σήμερα υπάρχει πληροφορία για διαπερατότητα επί του αμφιβληστροειδή μετά ενδοϋαλοειδική ένεση<sup>6</sup> αλλά και μειωμένη τοξικότητα.<sup>113</sup> Επιπλέον, υπάρχουν και άλλοι τρόποι διαταραχής του αιματοαμφιβληστροειδικού φραγμού και αύξησης της διαπερατότητας μέσω της έσω αφοριστικής μεμβράνης, όπως η εφαρμογή θερμικού laser (argon, 532 nm).

Συμπερασματικά, αυτή η σειρά ασθενών, δεν μπόρεσε να αναδείξει όφελος σε ασθενείς με απόφραξη φλέβας αμφιβληστροειδή που υπεβλήθησαν σε υαλοειδεκτομή, ανταλλαγή υγρού αέρα, και ενδοϋαλοειδική ένεση με tPA, ενώ τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν με την πειραματική σειρά.<sup>115,116</sup> Οι μελλοντικές προσπάθειες στην ενδοϋαλοειδική θρομβόλυση θα πρέπει να εστιαστούν στην ικανότητα του φαρμάκου να αποκτήσει πρόσβαση στον αγγειακό αυλό, σε επιπρόσθετες μηχανικές προσεγγίσεις (laser, καθετηριασμός κλπ) και ακόμα και σε άλλους φαρμακευτικούς παράγοντες. Πιθανοί τρόποι είναι η χρήση και άλλων μεθόδων τροποποίησης φαρμάκων, πχ νανοσφαιρίδια, φορτισμένα αρνητικά λιποσώματα κα., αλλά και η εισαγωγή τεχνικών που διαταράσσουν τον αιματοαμφιβληστροειδικό φραγμό, πριν την εισαγωγή του φαρμάκου στην υαλοειδική κοιλότητα, όπως έχει προταθεί από άλλους ερευνητές.

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η φλεβική θρόμβωση αποτελεί μια από τις σημαντικότερες αγγειακές παθήσεις του οφθαλμού με τα θρομβωτικά επεισόδια να είναι η δεύτερη κατά σειρά συχνότητας αγγειακή πάθηση του αμφιβληστροειδή μετά την διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια. Σύμφωνα με την τρέχουσα θεραπευτική πρακτική δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία για τη φλεβική θρόμβωση του αμφιβληστροειδή είτε αφορά την κεντρική φλέβα είτε κάποιον από τους κλάδους της.

## ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα έρευνα σκοπό έχει τη λύση του θρόμβου, με εξωαγγειακή επί του θρομβωμένου αγγείου έγχυση ανασυνδυσμένου ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (rt-PA), σε κλινική αλλά και πειραματική σειρά θρόμβωσης φλέβας αμφιβληστροειδικών αγγείων.

## ΥΛΙΚΟ – ΜΕΘΟΔΟΣ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Κλινικό Μέρος

Συμπεριλήφθησαν στην μελέτη 3 ασθενείς με πρόσφατη θρόμβωση κεντρικής φλέβας και 3 με θρόμβωση κλάδου φλέβας του αμφιβληστροειδή. Τεχνική: όλοι οι ασθενείς υπεβλήθησαν σε υαλοειδεκτομή, ανταλλαγή υγρού-αέρα και τελικά ενδοϋαλοειδική ένεση 50 μg t-PA / 0,5 ml. Παρότι δεν παρατηρήθηκαν διεγχειρητικές επιπλοκές, προέκυψαν προβληματισμοί για την ασφάλεια της ενδοϋαλοειδικής ένεσης t-PA. Σ' αυτήν την σειρά ασθενών, δεν προέκυψαν ενδείξεις για βελτίωση της φυσικής πορείας της νόσου.

### Πειραματικό Μέρος

Αναπτύχθηκε μοντέλο θρόμβωσης επιπολής ωτιαίων φλεβών κονίκλου με φωτοδυναμική θεραπεία (φθαλοκυανίνη, βερτεπορφίνη και διοδικό laser). Έγινε προσπάθεια για λύση του θρόμβου με διάφορες συγκεντρώσεις θρομβολυτικού



παράγοντα σε υποδόρια ένεση, παρακείμενα του θρόμβου (εξωαγγειακά). Η κλινική παρατήρηση και η ιστολογία ήταν αρνητική για λύση του θρόμβου.

Αναπτύχθηκε μοντέλο θρόμβωσης αμφιβληστροειδικών φλεβών κονίκλου με φωτοδυναμική θεραπεία (φθαλοκυανίνη) και παρατηρήθηκε η φυσική πορεία του θρόμβου. Έγινε προσπάθεια για λύση του θρόμβου με διάφορες συγκεντρώσεις θρομβολυτικού παράγοντα σε ενδοϋαλοειδική ένεση. Η κλινική παρατήρηση και η ιστολογία ήταν αρνητική για λύση του θρόμβου. Η ανοσοϊστοχημεία ήταν αρνητική για παρουσία t-PA ενδοαγγειακά.

Στη συνέχεια η θρομβολυτική ουσία εγκλωβίστηκε σε λιποσώματα για αύξηση της διαπερατότητας από την έσω αφοριστική μεμβράνη και το αγγειακό τοίχωμα με διάφορες μεθόδους και σε διάφορο μέγεθος και συγκεντρώσεις. Εφαρμόστηκε ενδοϋαλοειδικά στα παραπάνω πειραματικά μοντέλα αλλά δεν βελτιώθηκε η πορεία λύσης του θρόμβου (κλινικά, φλουροαγγειογραφία). Η ανοσοϊστοχημεία ήταν αρνητική για παρουσία λιποσωματικού t-PA ενδοαγγειακά μετά ενδοϋαλοειδική ένεση.

#### *ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ*

Η κλινική μελέτη δεν μπόρεσε να δείξει όφελος στους 6 ασθενείς (3 με θρόμβωση κεντρικής φλέβας και 3 με θρόμβωση κλάδου φλέβας αμφιβληστροειδούς, που υποβλήθηκαν σε υαλοειδεκτομή, ανταλλαγή υγρού – αέρα, και ενδοϋαλοειδική ένεση rt-PA).

Η πειραματική μελέτη δεν μπόρεσε να δείξει όφελος στη λύση του θρόμβου μετά ενδοϋαλοειδική έγχυση rt-PA αλλά και ενδοϋαλοειδική έγχυση rt-PA σε λιποσώματα. Επίσης έδειξε ότι στις 2 μορφές θρομβολυτικού παράγοντα (με / χωρίς λιποσώματα) δεν κατέστη δυνατό να διαπεράσει το αγγειακό τοίχωμα και να αναγνωριστεί ενδοαγγειακά μετά από εξωαγγειακή (ενδοϋαλοειδική) χορήγηση.

# SUMMARY

---

## *INTRODUCTION*

Venous occlusion is one of the major blood vessel diseases of the eye, with thrombotic episodes to be the second in order of frequency of vascular diseases of the retina, after diabetic retinopathy. Under current therapeutic practice there is no effective treatment for central or branch retinal vein occlusion.

## *AIM*

This research seeks thrombus dissolution with extravascular – nearby the occluded vessel, administration of recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA), in a clinical and experimental case series of retinal vein thrombosis.

## *MATERIAL – METHODS - RESULTS*

### *Clinical Study*

3 patients with recent central retinal vein occlusion and 3 patients with branch vein occlusion included in this case series. Technique: all patients underwent vitrectomy, fluid – air exchange and finally intravitreal injection of 50 µg t-PA / 0,5 ml. No improvement of the expected natural course of the disease, was noticed in these cases. Although no intra-operative complications were noticed, some safety concerns were arisen about the t-PA intravitreal injections.

### *Experimental Study*

We developed an experimental rabbit model of superficial ear vein thrombosis with the use of photodynamic therapy (phthalocyanine or verteporfin and proprietary diode laser). We tried to perform thrombus lysis with subcutaneous injection of various concentrations of thrombolytic agent, nearby the occluded vessel. Clinical observation (retro-illumination) and histology results revealed thrombus presence, despite therapy.

We developed an experimental rabbit model of photodynamic retinal vein thrombosis and observed its natural course; we injected intravitreally various concentrations of tPA. Clinical examination (fundoscopy) and histology revealed no improvement, and immuno-histochemistry was negative for tPA presence inside the retina or the vascular lumen.

Afterwards, we entrapped tPA in liposomes in order to improve its permeability through inner limited membrane and retinal vessel wall, in various techniques, sizes and concentrations. We injected intravitreally this modified drug in the rabbit eye thrombosis model (see above), but no improvement of thrombus course was noticed (fundoscopy, fluorescein angiography). Immuno-histochemistry was negative for liposomal-tPA presence inside the vascular lumen.

### *CONCLUSIONS*

This clinical study could not show benefit to these 6 patients (3 with central vein occlusion, and 3 with branch vein occlusion), who underwent vitrectomy, fluid – air exchange and intravitreal injection of rt-PA.

Experimental research shown no benefit for thrombus lysis, after intravitreal injection rt-PA and rt-PA in liposomes; further more shown that both forms of the drug (with/without liposomes) could not penetrate the vascular wall and recognized into the vessel lumen, following extravascular (intravitreal) administration.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

---

1. Weinberg DV, Seddon JM. Venous occlusive diseases of the retina. In: Albert DM, Jakobiec FA, eds. Principles and Practice of Ophthalmology. 1st ed. Vol 2. Philadelphia: WB Saunders, 1994:735–746.
2. Βασικές Επιστήμες και Οφθαλμολογία, Τόμος 2, *Basic and Clinical Science Course*, American Academy of Ophthalmology, Εκδόσεις Πασχαλίδη, 1997: 71 και 75
3. Cunha-Vaz JG. The blood-retinal barriers system. Basic concepts and clinical evaluation. *Exp Eye Res.* 2004 Mar;78(3):715-21
4. Βασικές Επιστήμες και Οφθαλμολογία, Τόμος 2, *Basic and Clinical Science Course*, American Academy of Ophthalmology, Εκδόσεις Πασχαλίδη, 1997: 76.
5. Pitkänen L, Ruponen M, Nieminen J, Urtti A. Vitreous is a barrier in nonviral gene transfer by cationic lipids and polymers. *Pharm Res.* 2003 Apr;20(4):576-83.
6. Kwan AS, Vijayasekaran S, McAllister IL, Yu PK, and Yu D-Y. A Study of Retinal Penetration of Intravitreal Tenecteplase in Pigs *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:2662–2667
7. Barber AJ, Antonetti DA. Mapping the blood vessels with paracellular permeability in the retinas of diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Dec;44(12):5410-6.
8. Murata T, Nakagawa K, Khalil A, Ishabashi T, Inomata H, Sueishi K (1996) The relation between expression of vascular endothelial growth factor and breakdown of the blood-retinal barrier in diabetic rat retinas. *Lab Invest* 1996;74:819–825.
9. Ozaki H, Hayashi H, Viores SA, Moromizato Y, Campochiaro PA, Oshima K. Intravitreal sustained release of VEGF causes retinal neovascularisation in rabbits and breakdown of the blood-retinal barrier in rabbits and primates. *Exp Eye Res* 1997; 64:505–517.
10. Coco RM, López MI, Pastor JC, Nozal MJ. Pharmacokinetics of intravitreal vancomycin in normal and infected rabbit eyes. *J Ocul Pharmacol Ther.* 1998 Dec;14(6):555-63.

11. Hayreh SS, Zimmerman MB, Podhajsky P. Incidence of various types of retinal vein occlusion and their recurrence and demographic characteristics. *Am J Ophthalmol*. 1994;117:429-41
12. Branch Vein Occlusion Study Group. Argon laser photocoagulation for macular edema in branch vein occlusion. *Am J Ophthalmol* 1984;98:271– 82
13. Clemett RS, Kohner EM, Hamilton AM. The visual prognosis in retinal branch vein occlusion. *Trans Ophthalmol Soc U K*. 1973;93(0):523-35.
14. Hayreh SS. Classification of central retinal vein occlusion. *Ophthalmology*. 1983;90:458-74
15. Central Vein Occlusion Study Group. Natural history and clinical management of central retinal vein occlusion. *Arch Ophthalmol* 1997;115:486 –91
16. Dhote R, Bachmeyer C, Orellou MH, et al. Central retinal vein thrombosis associated with resistance to activated protein C. *Am J Ophthalmol*. 1995;120:388-9
17. Glacet-Bernard A, Chabanel A, Lelong F, et al. Elevated erythrocyte aggregation in patients with central retinal vein occlusion and without conventional risk factors. *Ophthalmology*. 1994;101:1483-7
18. Vine, AK. Hyperhomocystinemia: a new risk factor for central retinal vein occlusion. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 2000;98:453-503
19. Morley MG and Heier JS. Venous Obstructive Disease of the Retina. In: *Ophthalmology*, Yanoff A and Ducker JS, Second Edition, St Louis Mosby. 2004; 866-867
20. Quinlan PM, Elman MJ, Bhatt AK, Mardesich P, Enger C. The natural course of central retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol*. 1990 Aug 15;110(2):118-23
21. Klein R, Klein BE, Moss SE, Meuer SM. The epidemiology of retinal vein occlusion: the Beaver Dam Eye Study. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2000;98:133– 41, discussion 141–3.
22. Mitchell P, Smith W, Chang A. Prevalence and associations of retinal vein occlusion in Australia: the Blue Mountains Eye Study. *Arch Ophthalmol* 1996;114:1243–7.

23. David R, Zangwill L, Badarna M, Yassur Y. Epidemiology of retinal vein occlusion and its association with glaucoma and increased intraocular pressure. *Ophthalmologica* 1988;197:69–74
24. Duker JS, Brown GL. Anterior location of the crossing artery in branch retinal vein occlusion. *Arch Ophthalmol*. 1989;107:998-1000
25. The Central Vein Occlusion Study Group. Evaluation of grid pattern photocoagulation for macular edema in central vein occlusion: the Central Vein Occlusion Study Group M Report. *Ophthalmology*. 1995;102:1425-33
26. Luckie AP, Wroblewski JJ, Hamilton P, et al. A randomized prospective study of outpatient haemodilution for central retinal vein obstruction. *Aust N Z J Ophthalmol* 1996;24: 223–32.
27. Williamson TH, O'Donnell A. Intravitreal triamcinolone acetonide for cystoid macular edema in nonischemic central retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol*. 2005 May;139(5):860-6
28. Cekic O, Chang S, Tseng JJ, Barile GR, Weissman H, Del Priore LV, Schiff WM, Weiss M, Klancnik JM Jr. Intravitreal triamcinolone treatment for macular edema associated with central retinal vein occlusion and hemiretinal vein occlusion. *Retina*. 2005 Oct-Nov;25(7): 846-50
29. Jonas JB, Akkoyun I, Kamppeter B, Kreissig I, Degenring RF. Intravitreal triamcinolone acetonide for treatment of central retinal vein occlusion. *Eur J Ophthalmol*. 2005 Nov-Dec; 15(6):751-8
30. Iturralde D, Spaide RF, Meyerle CB, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of macular edema in central retinal vein occlusion: a short-term study. *Retina*. 2006 Mar;26(3): 279-84
31. Rosenfeld PJ, Fung AE, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for macular edema from central retinal vein occlusion. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2005 Jul-Aug;36(4):336-9
32. McAllister IL, Constable IJ. Laser-induced chorioretinal venous anastomosis for treatment of nonischemic central retinal vein occlusion. *Arch Ophthalmol*. 1995 Apr; 113(4):456-62. 15.
33. Leonard BC, Coupland SG, Kertes PJ, Bate R. Long-term follow-up of a modified technique for laser-induced chorioretinal venous anastomosis in nonischemic central retinal vein occlusion. *Ophthalmology*. 2003 May;110(5):948-54

34. Mirshahi A, Roohipoor R, Lashay A, Mohammadi SF, Mansouri MR Surgical induction of chorioretinal venous anastomosis in ischaemic central retinal vein occlusion: a non-randomised controlled clinical trial. *Br J Ophthalmol*. 2005 Jan;89(1):64-9
35. Opremcak EM, Rehmar AJ, Ridenour CD, Kurz DE. Radial optic neurotomy for central retinal vein occlusion: 117 consecutive cases. *Retina*. 2006 Mar;26(3):297-305
36. Hayreh SS. Radial optic neurotomy for central retinal vein occlusion. *Retina* 2002; 22(6): 827
37. Hayreh SS. Prevalent misconceptions about acute retinal vascular occlusive disorders. *Prog Retin Eye Res*. 2005 Jul;24(4):493-519.
38. Green WR, Chan CC, Hutchins GM, Terry JM. Central retinal vein occlusion: a prospective histopathologic study of 29 eyes in 28 cases. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1981;79:371-422.
39. Elman MJ, Thrombolytic therapy for central retinal vein occlusion : results of a pilot study. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1996; 94: 471-504
40. Lahey JM, Fong DS, Kearney J.: Intravitreal tissue plasminogen activator for acute central retinal vein occlusion. *Ophthalmic Surg Lasers*. 1999 Jun;30(6):427-34.
41. Ghazi NG Nouredine B, Haddad RS, Jurdi FA, Bashshur ZF. Intravitreal tissue plasminogen activator in the management of central retinal vein occlusion. *Retina*. 2003 Dec; 23 (6): 780-4.
42. Weiss JN, Bynoe IA. Injection of tissue plasminogen activator into a branch retinal vein in eyes with central retinal vein occlusion. *Ophthalmology* 2001; 108 (12): 2249-57.
43. Paques M, Vallee JN, Herbreteau D, et al. Superselective ophthalmic artery fibrinolytic therapy for the treatment of central retinal vein occlusion. *Br J Ophthalmol*. 2000; 84(12): 1387-91
44. Chen SD, Sundaram V, Lochhead J, Patel CK. Intravitreal Triamcinolone for the Treatment of Ischemic Macular Edema Associated With Branch Retinal Vein Occlusion. *Am J Ophthalmol*. 2006 May;141(5):876-883.
45. Jonas JB, Akkoyun I, Kampeter B, Kreissig I, Degenring RF. Branch retinal vein occlusion treated by intravitreal triamcinolone acetonide. *Eye*. 2005 Jan;19(1):65-71

46. Osterloh MD, Charles S. Surgical decompression of branch retinal vein occlusions. *Arch Ophthalmol*. 1988 Oct;106(10):1469-71
47. Opremcak EM, Bruce RA. Surgical decompression of branch retinal vein occlusion via arteriovenous crossing sheathotomy: a prospective review of 15 cases. *Retina*. 1999;19(1):1-5
48. Mason J 3rd, Feist R, White M Jr, Swanner J, McGwin G Jr, Emond T. Sheathotomy to decompress branch retinal vein occlusion: a matched control study. *Ophthalmology*. 2004 Mar;111(3):540-5
49. Yamamoto S, Saito W, Yagi F, Takeuchi S, Sato E, Mizunoya S. Vitrectomy with or without arteriovenous adventitial sheathotomy for macular edema associated with branch retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol*. 2004 Dec;138(6):907-14
50. García-Arumí J, Martínez-Castillo V, Boixadera A, Blasco H, Corcostegui B. Management of macular edema in branch retinal vein occlusion with sheathotomy and recombinant tissue plasminogen activator. *Retina*. 2004 Aug;24(4):530-40
51. Rabena MD, Pieramici DJ, Castellarin AA, Nasir MA, Avery RL. Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of macular edema secondary to branch retinal vein occlusion. *Retina*. 2007 Apr-May;27(4):419-25
52. Spandau U, Wickenhäuser A, Rensch F, Jonas J. Intravitreal bevacizumab for branch retinal vein occlusion. *Acta Ophthalmol Scand*. 2007 Feb;85(1):118-9
53. Παπαδημητρίου ΚΣ. Κυκλοφοριακές διαταραχές: θρόμβωση. Σε: *Γενική Παθολογία και Παθολογική Ανατομική*. Λίτσας. Αθήνα 1988: 59-64.
54. Bachmann F. Plasminogen Activators. In: Colman R, Hirsh J, Marder V, Salzman E. *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principle and Clinical Practice. Second Edition*. TB Lippincott Company. 1987:318-21.
55. Llevadot J, Giugliano RP, Antman EM. Bolus fibrinolytic therapy in acute myocardial infarction. *JAMA*. 2001 Jul 25;286(4):442-9.
56. Μαρκάκης Κ. Μηχανισμός ινωδόλυσης. *Ιατρική* 1995(68) Suppl: 20-25.
57. Kanemoto N, Goto Y, Hirosawa K, Kawai C, Kimata S, Yui Y, Yamamoto Y. Intravenous recombinant tissue-type plasminogen activator in patients with acute myocardial infarction--a report from the multicenter thrombolysis trial. *Jpn Circ J*. 1990 Jan;54(1):71-81.



58. GUSTO Angiographic Investigators. The comparative effects of tissue plasminogen activator, streptokinase, or both on coronary artery patency, ventricular function and survival in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1993; 329: 1615-22
59. Moser M, Kohler B, Schmittner M, Bode C. Recombinant plasminogen activators: a comparative review of the clinical pharmacology and therapeutic use of alteplase and reteplase. *BioDrugs*. 1998 Jun;9(6):455-63.
60. GUSTO-III. A comparison of reteplase with alteplase for acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1997; 337: 1118-23
61. Casey WJ 3rd, Craft RO, Rebecca AM, Smith AA, Yoon S. Intra-arterial tissue plasminogen activator: an effective adjunct following microsurgical venous thrombosis. *Ann Plast Surg*. 2007 Nov;59(5):520-5
62. Dávalos A. Thrombolysis in acute ischemic stroke: successes, failures, and new hopes. *Cerebrovasc Dis*. 2005;20 Suppl 2:135-9.
63. Dick AP, Straka J. IV tPA for acute ischemic stroke: results of the first 101 patients in a community practice. *Neurologist*. 2005 Sep;11(5):305-8.
64. Grunwald MR, Hofmann LV. Comparison of urokinase, alteplase, and reteplase for catheter-directed thrombolysis of deep venous thrombosis. *J Vasc Interv Radiol*. 2004 Apr;15(4): 347-52.
65. Zorzanello MM, Fleming WJ, Prowant BE. Use of tissue plasminogen activator in peritoneal dialysis catheters: a literature review and one center's experience. *Nephrol Nurs J*. 2004 Sep-Oct;31(5):534-7
66. Opatrný K Jr, Zemanová P, Opatrná S, Vít L. Fibrinolysis in chronic renal failure, dialysis and renal transplantation. *Ann Transplant*. 2002;7(1):34-43
67. Handwerker BA, Blodi BA, Chandra SR, et al. Treatment of submacular hemorrhage with low-dose intravitreal tissue plasminogen activator injection and pneumatic displacement. *Arch Ophthalmol* 2001;119:28–32
68. Carreras Egana B, Ruiz Lapuente C, Peyman GA, et al. Intravitreal distribution of tissue plasminogen activator in non vitrectomised and fibrin-filled vitrectomized eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997(March);38(4):212 Suppl.

69. Hattenbach LO, Allers A, Gumbel HO, et al. Vitreous concentrations of TPA and plasminogen activator inhibitor are associated with VEGF in proliferative diabetic vitreoretinopathy. *Retina* 1999;19(5):383-9.
70. Mahmoud TH, Peng YW, Proia AD, Davidson M, Deramo VA, Fekrat S. Recombinant tissue plasminogen activator injected into the vitreous cavity may penetrate the retinal veins of a porcine model of vascular occlusion. *Br J Ophthalmol*. 2006 Jul;90(7):911-5.
71. Ohm J. Über die behandlung der netzhautablösung durch operative entleerung der subretinalen flüssigkeit und einspritzung von luft in den glaskörper. *Albrecht von Graefes Arch Ophthalmol* 1911;79:442-450.
72. Schneider J, Frankel SS. Treatment of late postoperative intraocular infections with intraocular injection of penicillin. *Arch Ophthalmol* 1947;37:304-307.
73. Rycroft B. Penicillin and the control of deep intraocular infection. *Br J Ophthalmol* 1945;29:57-87.
74. Myles ME, Neumann DM, Hill JM. Recent progress in ocular drug delivery for posterior segment disease: emphasis on transscleral iontophoresis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005 Dec 13;57(14):2063-79.
75. Ganciclovir implants (Vitraser). *Treat Rev*. 1996 Apr;(no 21):10
76. Lim LL, Smith JR, Rosenbaum JT. Retisert (Bausch & Lomb/Control Delivery Systems). *Curr Opin Investig Drugs*. 2005 Nov;6(11):1159-67
77. Kuppermann BD, Williams GA, Blumenkranz MS, et al. Efficacy and safety of a novel intravitreous dexamethasone drug-delivery system after applicator or incisional placement in patients with macular edema [abstract]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47:E-Abstract 5913
78. Moshfeghi AA, Peyman GA. Micro- and nanoparticulates. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57:2047-2052.
79. Moritera T, Ogura Y, Yoshimura N, et al. Biodegradable microspheres containing adriamycin in the treatment of proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33:3125-3130

80. Bourges JL, Gautier SE, Delie F, et al. Ocular drug delivery targeting the retina and retinal pigment epithelium using polylactide nanoparticles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:3562–3569
81. Antmisiaris SG. Liposomes: A modern formulation type for administration and targeting of drugs. In: *Socrates 3<sup>rd</sup> International Intensive course and workshop on Liposome technology in Therapeutics*. September 1-11, 2003, Patras, Greece.
82. Ebrahim S, Peyman GA, Lee PJ. Applications of liposomes in ophthalmology. *Surv Ophthalmol*. 2005 Mar-Apr;50(2):167-82.
83. Bochot A, Couvreur P, Fattal E. Intravitreal administration of antisense oligonucleotides: potential of liposomal delivery. *Prog Retin Eye Res*. 2000 Mar;19(2):131-47.
84. Barza M, Stuart M, Szoko F. Effect of Size and Lipid Composition on the Pharmacokinetics of Intravitreal Liposomes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1987(28):893-900.
85. Iliaki OE, Naoumidi II, Tsilimbaris MK, Pallikaris IG. Photothrombosis of retinal and choroidal vessels in rabbit eyes using chloroaluminum sulfonated phthalocyanine and a diode laser. *Lasers Surg Med*. 1996;19(3):311-23.
86. Tsilimbaris MK, Pallikaris IG, Naoumidi II, Vlahonikolis IG, Tsakalof AK, Lydataki SE. Phthalocyanine mediated photodynamic thrombosis of experimental corneal neovascularization: effect of phthalocyanine dose and irradiation onset time on vascular occlusion rate. *Lasers Surg Med*. 1994;15(1):19-31
87. Ηλιάκη ΟΕ. Φωτοθρόμβωση φυσιολογικών αγγείων του αμφιβληστροειδή και χοριοειδή κουνελιών με τη χρήση diode laser και Φθαλοκυανίνης. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Ιατρικής, Διδακτορικές διατριβές;1998, Μάιος, DIS0500
88. Τσιλιμπάρης ΜΚ. Φωτοθρόμβωση της νεοαγγείωσης του κερατοειδούς κουνελιών με τη βοήθεια φθαλοκυανίνης και διοδικό laser. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Ιατρικής, Διδακτορικές διατριβές;1994, Μάιος DIS0054
89. Kirby C and Gregoriadis G. Dehydration-rehydration vesicles (DRV): A new method for high yield drug entrapment in liposomes. *Biotechnology*, 1984; 2, 979-984.
90. Ntimenou V, Mourtas S, Christodoulakis EV, Tsilimbaris M, Antimisiaris SG. Stability of protein-encapsulating DRV liposomes after freeze-drying: A study with BSA and t-PA. *J Liposome Res*. 2006;16(4):403-16.

91. Murakami T, Takagi H, Kita M, et al. Intravitreal tissue plasminogen activator to treat macular edema associated with branch retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol*. 2006 Aug; 142(2):318-20.
92. Glacet-Bernard A, Kuhn D, Vine AK, et al. Treatment of recent onset central retinal vein occlusion with intravitreal tissue plasminogen activator: a pilot study. *Br J Ophthalmol* 2000; 84(6):609-13.
93. Lam HD, Blumenkranz MS. Treatment of central retinal vein occlusion by vitrectomy with lysis of vitreopapillary and epipapillary adhesions, subretinal peripapillary tissue plasminogen activator injection, and photocoagulation. *Am J Ophthalmol* 2002;134(4):609-11.
94. Christodoulakis EV, Tsilimbaris MK, Panteleontidis VA, Pallikaris IG. Extravascular in situ thrombolytic (r-TPA) application for the management of retinal vein thrombosis - Short term results. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44: Abstract 4054.
95. Kamei M, Misono K and Lewis H. A Study of the Ability of Tissue Plasminogen Activator to Diffuse Into the Subretinal Space After Intravitreal Injection in Rabbits. *Am J Ophthalmol* 1999; 128:739-746.
96. D'Angelo A, Mannucci PM. Outcome of treatment of deep vein thrombosis with urokinase: relationship to dosage, duration of therapy, age of thrombus and laboratory changes. *Thromb Haemost* 1984; 51:236-9.
97. Hassan AS, Johnson MW, Schneiderman TE, et al. Management of submacular hemorrhage with intravitreal tissue plasminogen activator injection and pneumatic displacement. *Ophthalmology* 1999;106:1900-7.
98. Siren V, Immonen I. uPA, tPA and PAI-1 mRNA expression in periretinal membranes. *Curr Eye Res* 2003 Nov; 27(5):261-7.
99. Chen SN, Yang TC, Ho CL, Kuo YH, Yip Y, Chao AN. Retinal toxicity of intravitreal tissue plasminogen activator: Case report and literature review. *Ophthalmology* 2003; 110(4):704-8.
100. Christodoulakis EV, Tsilimbaris MK. The Role of Vitrectomy Assisted rt-PA Injection for the Management of Branch Retinal Vein Occlusion: Case Report. *Semin Ophthalmol*. 2007 ; 22(2):89-93.

101. Boone DE, Boldt HC, Ross RD, Folk JC, Kimura AE. The use of intravitreal tissue plasminogen activator in the treatment of experimental subretinal hemorrhage in the pig model. *Retina*. 1996;16:518–524.
102. Pulido JS, Bakri SJ, Valyi-Nagy T, Shukla D. Rituximab penetrates full-thickness retina in contrast to tissue plasminogen activator control. *Retina*. 2007 Oct;27(8):1071-3.
103. Russell SR, Shepherd JD, Hageman GS. Distribution of glycoconjugates in the human retinal internal limiting membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991;32:1986–1995.
104. Heegaard S, Jensen OA, Prause JU. Structure and composition of the inner limiting membrane of the retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1986;224:355–360.
105. Pitkanen L, Pelkonen J, Ruponen M, Ronkko S, Urtti A. Neural retina limits the non-viral gene transfer to retinal pigment epithelium in an in vitro bovine eye model. *AAPS J*. 2004;6:Article 25.
106. Bunt-Milam AH, Saari JC, Klock IB, Garwin GG. Zonulae adherentes pore size in the external limiting membrane of the rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1985 Oct;26(10):1377-80.
107. Jackson TL, Antcliff RJ, Hillenkamp J, et al. Human retinal molecular weight exclusion limit and estimate of species variation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:2141–2146.
108. Takeuchi A, Kricorian X, Yao Y, Kenny JW, Marmor MF. The rate and source of albumin entry into saline-filled experimental retinal detachments. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:3792–3798.
109. Cannon JP, Fiscella R, Pattharachayakul S, et al. Comparative toxicity and concentrations of intravitreal amphotericin B formulations in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 May;44(5):2112-7
110. Benchenane K, Vincent Berezowski V, Ali C, et al. Tissue-Type Plasminogen Activator Crosses the Intact Blood-Brain Barrier by Low-Density Lipoprotein Receptor–Related Protein-Mediated Transcytosis. *Circulation*. 2005;111:2241-2249.
111. Christodoulakis EV, Antimisiaris SA, Naoumidi II, Panteleontidis VA, Skondra DIX, Pallikaris IG, Tsilimbaris MK. t-PA encapsulation in liposomes for extravascular administration in venous thrombosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:Abstract 5223.
112. Prince JH, McConnell DG. Retina and optic nerve. In: Prince JH. *The Rabbit in Eye Research*. Springfield, IL: CC Thomas; 1964:385–448.

- 
113. Rowley SA, Vijayasekaran S, Yu PK, McAllister IL, Yu DY. Retinal toxicity of intravitreal tenecteplase in the rabbit. *Br J Ophthalmol.*2004;88:573–578
114. Christodoulakis EV, Antimisiaris SA, Grigoryan EN, Naoumidi II, Maniadi V, Tsilimbaris MK. Intravitreal injection of tPA entrapped in liposomes, in experimental retinal vein photothrombosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46: Abstract 4038
115. Christodoulakis EV, Antimisiaris S, Grigoryan E, Harisis S, and Tsilimbaris MK. The Role of Intravitreal t-PA, in an Experimental Model of Retinal Vein Thrombosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006 47: Abstract 5168.

## **1. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ – ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ**

- **Seminars in Ophthalmology**
- **Journal of Liposome Research**
- **Ophthalmic Surgery Lasers & Imaging** (accept letter)
- **Ανακοινώσεις σε Συνέδρια – Δημοσιεύσεις σε  
Περιοδικά Συνεδρίων**

Μέρος αυτής της διατριβής έχει δημοσιευτεί σε έγκριτα περιοδικά, και τα πρωτότυπα άρθρα επισυνάπτονται παρακάτω.

Στο τέλος ακολουθεί σειρά ανακοινώσεων σε συνέδρια – ιατρικά περιοδικά – βιβλία συνεδρίων, με υλικό που πηγάζει από την παρούσα διατριβή.



# The Role of Vitrectomy Assisted rt-PA Injection for the Management of Branch Retinal Vein Occlusion: Case Report

**Emmanouil V.**

**Christodoulakis and  
Miltiades K. Tsilimbaris**

Retina Service, Ophthalmology  
Clinic, Heraklion University  
Hospital, Crete, Greece

**ABSTRACT** Case reports on three patients who underwent vitrectomy assisted t-PA injection for the management of branch retinal vein occlusion. Three-port, 20-gauge vitrectomy was performed under local anesthesia. After posterior vitreous detachment and fluid-air exchange, 50  $\mu$ g t-PA/0.5 ml were injected in the eye. All patients were instructed for strict supine position for 6 hours. Main outcome measure was visual acuity. Three patients with branch vein occlusion (BVO) were studied, with duration of symptoms less than 25 days, and mean follow-up period of 18.8 months. Although no intraoperative complications were noticed, no one showed any significant improvement of vision. One patient required a second operation for the management of intravitreal hemorrhage, and another developed an epiretinal membrane. Vitrectomy assisted t-PA injection does not seem to improve the course of branch retinal vein occlusion in this small case series. Future research on intravitreal thrombolysis needs to be focused on additional mechanical approaches and modalities that can facilitate the access of the drug into the vascular lumen.

**KEYWORDS** branch retinal vein occlusion, recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA), fibrinolysis, intravitreal injection

The authors hereby confirm that they have no commercial interest in any of the products used in this study and state that this work was funded by the Greek Ministry of Education and the European Union (25% from national funds and 75% from the European Social Fund), through "IRAKLITOS - Fellowships for Research of University of Crete" assigned to the Department of Medicine, University of Crete.

The authors would also like to thank Susana Exinger and Vasileia Maniadi for their support in retina photography.

Address correspondence to Miltiades K. Tsilimbaris, MD, Dpt. of Ophthalmology, Universital Hospital of Heraklion, Heraklion, 711 10, Greece. E-mail: tsilimb@med.uoc.gr

## INTRODUCTION

Branch retinal vein occlusion represents one of the most common retinal vascular disorders, and its visual outcome remains uncertain, and sometimes poor. In current daily practice, ophthalmologists follow patients with this kind of disorder by observation, and apply laser treatment only on complications, such as macular oedema, neovascularization or intravitreal haemorrhage. Very often the disease has poor prognosis despite conventional therapy, especially if macula participates.<sup>1</sup>

Several investigators have reported new therapeutic modalities. Mechanical approaches like arteriovenous adventitial sheathotomy<sup>2</sup> and retinal vein cannulation with or without t-PA infusion are currently under clinical investigation, with encouraging outcomes.<sup>3,4</sup> In addition the use of intravitreal steroids,<sup>5</sup> anti-VEGF factors<sup>6</sup> and thrombolytic agents (mainly recombinant

tissue plasminogen activator)<sup>7</sup> have been tried with controversial results. On attempt to avoid manipulations over the retinal surface, we tried to evaluate the safety and efficacy of intravitreal rt-PA injection alone after vitrectomy in patients with branch retinal vascular occlusion.

## METHODS

This is a prospective, institutional case series that began on May 2002 at the Ophthalmology Clinic of the University Hospital of Heraklion, Crete, Greece; the research protocol was approved by the Ethics Committee of Heraklion University Hospital; all patients were duly informed about the nature of the procedure and written consent was obtained.

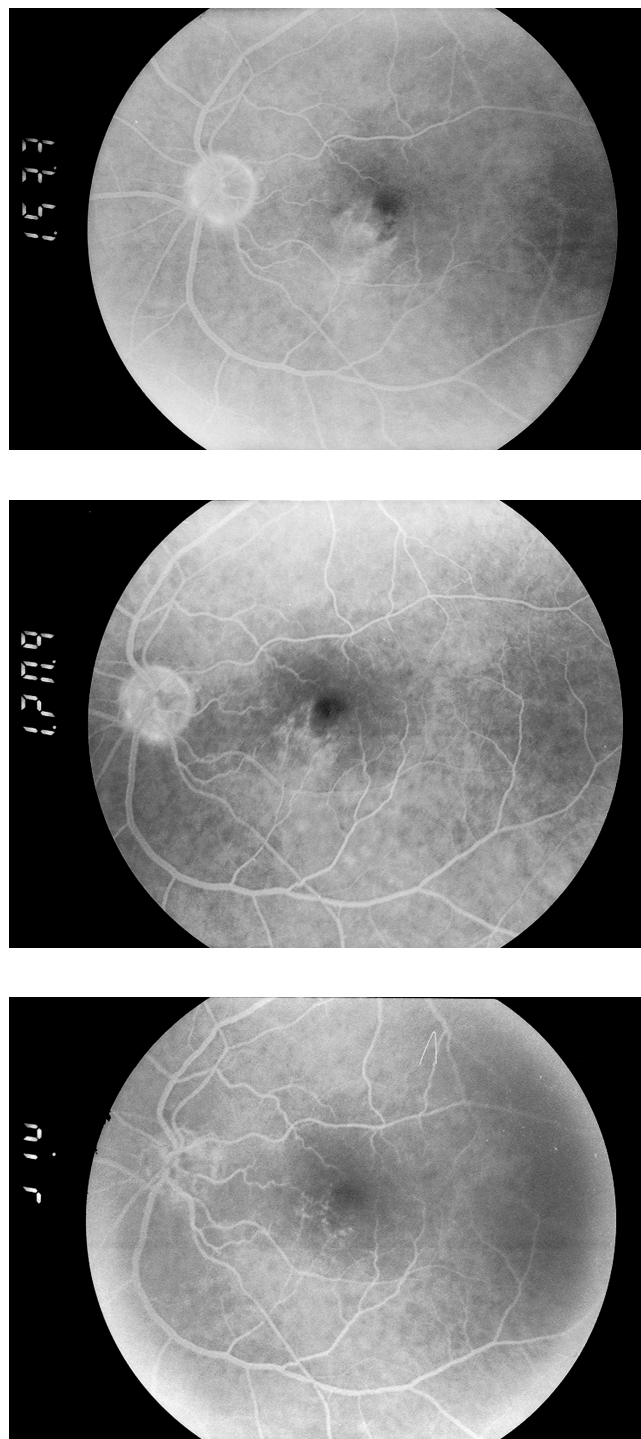
Patients with branch retinal vein occlusion, with duration of thrombosis less than one month and visual acuity less or equal to 0.3 (Snellen equivalent), were included in the study. Preoperative evaluation included visual acuity, applanation tonometry, slit lamp examination, gonioscopy, fundus biomicroscopy and fluorescein angiography. Patients were examined at day one, first week, first, third and sixth month, and follow-up visits continued in six-month intervals. Main outcome measure was visual acuity. Secondary outcome measures were the presence of complications and the necessity of reoperation.

All patients were operated using the same technique, under retrobulbar anaesthesia with a 1:1 combination of xylocaine 2% and bupivacaine 5% solutions. First, a three-port, 20-gauge vitrectomy was performed. If the posterior vitreous was not already detached, posterior vitreous detachment was induced, followed by fluid-air exchange. Then 50  $\mu$ g of recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) (Actilyse, Boehringer Ingelheim, Germany) diluted in 0.5 ml normal saline were infused in the vitreous cavity under air. At the end of the procedure all patients were advised for strict supine position for six hours.

## CASE REPORT

### Case 1

On May 2002, a 67-year-old woman presented with impaired vision in her left eye, lasting for 20 days. Her visual acuity was 0.3 Snellen equivalent, and her left eye suffered from inferior branch vein occlusion, with leakage affecting the central area (Figure 1A). The patient



**FIGURE 1** Patient 1 with left BVO (branch of inferior temporal vein). (A) Preoperative fluorescein angiography, time:1 min 53 sec; leakage in the central area. (B) 28 days postoperatively: improvement of leakage in angiography. (C) 11 months later: epiretinal membrane; notice the tortuous vessels in the central area (early phase).

underwent the study's procedure the same day. No intraoperative or early postoperative complications were noticed. She showed a rapid absorption of intraretinal hemorrhages and edema during the early postoperative

period, but no sign of circulatory restoration could be found in fluorescein angiography (Figure 1B). The patient developed a mild epiretinal membrane 10 months after the operation, which showed no signs of progression until her last visit (Figure 1C). Her initial vision was 0.3 and improved to 0.4 by the end of the follow-up period (month 42).

### Case 2

On June 2002, a 68-year-old woman presented with impaired vision in her right eye lasting for 21 days. Her visual acuity at presentation was finger counting at 1.5 meters. A superior branch vein occlusion affecting the central area of her right eye was diagnosed. The patient was operated on the next day. No complications were noticed. This patient was followed for a maximum of 4 months and then she was lost from follow-up. Her visual acuity at the last visit was finger counting at 2 meters (Table 1) and fluorescein angiography didn't show any improvement of thrombosis area.

### Case 3

In August 2002, a 76-year-old man presented with impaired vision in his left eye, lasting for 14 days. His visual acuity was 0.3 Snellen equivalent; an inferior branch vein occlusion was diagnosed in his left eye. The patient underwent the study's procedure the same day. No intraoperative complications were noticed. In the following days he developed a vitreous haemorrhage that required an additional uneventful vitrectomy to resolve. The final biomicroscopic and angiographic appearance (month 13) did not reveal any restoration in the potency of the occluded vessel; collaterals could be

seen at the border of thrombosed area. His final visual acuity (month 13) was reduced to 0.2 from the initial level of 0.3.

## DISCUSSION

Retinal vein occlusion is the second most common retinal vascular disorder after diabetic retinopathy and its visual prognosis remain poor. There is no acceptable therapy for restoring visual function and perfusion.<sup>1</sup> Recently, several investigators have shown an increasing interest in the possible therapeutic role of thrombolytic agents, especially recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA). This substance has been administered both systemically by means of intravenous injection,<sup>8</sup> and topically by intravitreal injection,<sup>7,9,10</sup> intravitreal injection after sheathotomy,<sup>3</sup> intravenous infusion after branch vein cannulation<sup>4</sup> and subretinal injection.<sup>11</sup>

Several investigators have tried to evaluate the efficacy of intravitreal injection of rt-PA in branch retinal venous occlusion. Murakami et al.<sup>7</sup> studied the role of intravitreal injection of tPA in patients with branch retinal vein occlusion and showed benefit for resolving macular edema; furthermore, Garcia-Arumi et al.<sup>3</sup> showed improvement of the anatomic and visual outcome of patients with BVO, after surgical venous decompression and injection of recombinant-tPA.

A number of parameters have been implicated as factors preventing the penetration of rt-PA into the thrombosed vessels after intravitreal injection, including the invagination of tPA into vitreous spaces.<sup>12</sup> In our study we selected to inject rt-PA after vitrectomy and fluid-air exchange. This permitted the immersion of the thrombosed vessel into solution with maximum concentration of rt-PA, allowing the potential for absorption into the retinal vasculature; moreover, we avoided any manipulation on the retina surface in order to maximize the safety and simplicity of the method. Nevertheless, no significant improvement in visual acuity was documented in any of our cases. The rheologic status of the retinal circulation remained unaltered in all cases, as documented by fluorescein angiography. All patients seemed to follow the natural course of their disease and retained visual acuity at approximately the level of their initial examination.

Despite the limitations of this study (small number of cases and absence of control group), the inability of

**TABLE 1 Patient Data**

Patient/sex	1F	2F	3M
Disease	BVO	BVO	BVO
Age	67	68	76
Eye	OS	OD	OS
BCVA	0.3	Fc 1.5 m	0.3
time (days)	20	21	14
F/UP (months)	42	4	13
BCVA (final)	0.4	Fc 2 m	0.2
Complications	ERM		VH
Reoperation	no	no	Vitrectomy

F: female, M: male, BVO: branch vein occlusion, time (days) refers to duration of symptoms before surgery, ERM: epiretinal membrane, VH: vitreous haemorrhage.

our procedure to change the visual prognosis and the rheologic status of these three patients raises questions about the efficacy of intravitreal injection of rt-PA for venous occlusions. Reasons of failure may include the inactivation of rt-PA into the vitreous cavity,<sup>13</sup> the inability of rt-PA to penetrate tissues and reach the thrombosed vessel or its inability to dissolve a thrombus in a particular stage of maturity at the time of injection. The ability of rt-PA to penetrate the internal limiting membrane is controversial. Mahmoud et al. showed that injection of t-PA into the vitreous cavity could penetrate the retinal vessels of pigs.<sup>14</sup> On the contrary, Kamei et al. observed (rabbits) that t-PA couldn't diffuse into subretinal space after intravitreal injection.<sup>15</sup> Garcia-Arumi et al. performed sheathotomy before fluid-air exchange and t-PA infusion, which in addition to decompression can change the internal limiting membrane and the barriers of the retinal circulation; thus the reported success from this author may be related to the combination of t-PA injection with mechanical manipulations facilitating its access to the intravascular space.<sup>3</sup> The age of vein occlusion may also be a limiting factor and there is evidence in the literature that only thrombi of recent development can be lysed;<sup>16</sup> the thrombosis of our patient had a mean duration of 18.3 days (range 14–25 days), which can be considered relatively short, in comparison to literature. Another reason for failure may be that venous occlusive disease is due to sclerotic phenomenon from the adjacent or crossing sclerotic arteriole; therefore, even if rt-PA crosses the venous wall, the mechanism of fibrinolysis alone may not be effective in relieving the occlusion.

The surgical procedure itself in these three cases was uneventful; however, the initially high concentration of the rt-PA in the air-filled eyes of our patients may raise some safety concerns. Although none of our patients developed any serious side-effect directly related to the operation, some follow-up findings may be rt-PA related. Patient three needed to be re-operated the first period after the procedure for vitreous hemorrhage and patient one developed a mild epiretinal membrane that did not require intervention. Early postoperative hemorrhages may be related to the thrombolytic action of rt-PA; Hassan et al.<sup>17</sup> in a series of 15 cases of intravitreal rtPA and pneumatic displacement for submacular haemorrhage reported 3 cases with vitreous haemorrhage (two of them required vitrectomy). Finally, the development of epiretinal membrane and fibrosis could also be rt-PA related.<sup>18</sup>

In conclusion, this small case series failed to show any benefit in patients with branch retinal vein occlusion that underwent vitrectomy, fluid-air exchange and rt-PA infusion into the vitreous cavity. Future research on intravitreal thrombolysis needs to be focused on the ability of the drug to get access into the vascular lumen and the additional mechanical approaches.<sup>3,4</sup> Strategies to overcome the possible limitations of our methodology may include the entrapping of rt-PA into vehicles (eg. liposomes), the adoption of techniques that derange the blood-retina barrier prior to rtPA infusion or the direct infusion of rtPA into the retinal venous system as proposed by other investigators.

## REFERENCES

- [1] The Branch Vein Occlusion Study Group. Argon laser photocoagulation for macular edema in branch vein occlusion. *Am J Ophthalmol* 1984; 98(3):271–82.
- [2] Opremcak EM, Bruce RA. Surgical decompression of branch retinal vein occlusion via arteriovenous crossing sheathotomy: a prospective review of 15 cases. *Retina* 1999; 19(1):1–5.
- [3] Garcia-Arumi J, Martinez-Castillo V, Boixadera A et al. Management of macular edema in branch retinal vein occlusion with sheathotomy and recombinant tissue plasminogen activator. *Retina* 2004; 24(4):530–40.
- [4] Weiss JN, Bynoe LA. Injection of tissue plasminogen activator into a branch retinal vein in eyes with central retinal vein occlusion. *Ophthalmology* 2001; 108:2249–57.
- [5] Cekic O, Chang S, Tseng JJ et al. Intravitreal triamcinolone injection for treatment of macular edema secondary to branch retinal vein occlusion. *Retina* 2005; 25(7):851–5.
- [6] Pai SA, Shetty R, Vijayan PB, et al. Clinical, anatomic, and electrophysiologic evaluation following intravitreal bevacizumab for macular edema in retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol*. 2007 Feb 14; [Epub ahead of print].
- [7] Murakami T, Takagi H, Kita M, et al. Intravitreal tissue plasminogen activator to treat macular edema associated with branch retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol*. 2006 Aug;142(2):318–20.
- [8] Elman MJ. Thrombolytic therapy for central retinal vein occlusion: results of a pilot study. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1996; 94:471–504.
- [9] Glacet-Bernard A, Kuhn D, Vine AK et al. Treatment of recent onset central retinal vein occlusion with intravitreal tissue plasminogen activator: a pilot study. *Br J Ophthalmol* 2000; 84(6):609–13.
- [10] Ghazi NG, Noureddine B, Haddad RS et al. Intravitreal tissue plasminogen activator in the management of central retinal vein occlusion. *Retina* 2003; 23(6):780–4.
- [11] Lam HD, Blumenkranz MS. Treatment of central retinal vein occlusion by vitrectomy with lysis of vitreopapillary and epipapillary adhesions, subretinal peripapillary tissue plasminogen activator injection, and photocoagulation. *Am J Ophthalmol* 2002;134(4):609–11.
- [12] Carreras Egana B, Ruiz Lapuente C, Peyman GA et al. Intravitreal distribution of tissue plasminogen activator in non vitrectomized and fibrin-filled vitrectomized eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997(March); 38(4):212 Suppl.
- [13] Hattenbach LO, Allers A, Gumbel HO et al. Vitreous concentrations of TPA and plasminogen activator inhibitor are associated with VEGF in proliferative diabetic vitreoretinopathy. *Retina* 1999; 19(5): 383–9.

- [14] Mahmoud TH, Peng YW, Proia A et al. Recombinant tissue plasminogen activator injected into the vitreous cavity may penetrate the retinal veins of a porcine model of vascular occlusion. *Br J Ophthalmol* 2006; 90(7):911–5.
- [15] Kamei M, Misono K and Lewis H. A study of the ability of tissue plasminogen activator to diffuse into the subretinal space after intravitreal injection in rabbits. *Am J Ophthalmol* 1999; 128:739–46.
- [16] D'Angelo A, Mannucci PM. Outcome of treatment of deep vein thrombosis with urokinase: relationship to dosage, duration of therapy, age of thrombus and laboratory changes. *Thromb Haemost* 1984; 51:236–9.
- [17] Hassan AS, Johnson MW, Schneiderman TE, et al. Management of submacular hemorrhage with intravitreal tissue plasminogen activator injection and pneumatic displacement. *Ophthalmology* 1999; 106:1900–7.
- [18] Siren V, Immonen I. uPA, tPA and PAI-1 mRNA expression in periretinal membranes. *Curr Eye Res* 2003 Nov; 27(5):261–7.



## Stability of Protein-Encapsulating DRV Liposomes After Freeze-Drying: A Study with BSA and t-PA

VASSILIKI NTIMENOU,<sup>1</sup> SPYRIDON MOURTAS,<sup>1</sup>  
EMMANOUIL V. CHRISTODOULAKIS,<sup>2</sup> MILTIADIS  
TSILIMBARIS,<sup>2</sup> AND SOPHIA G. ANTIMISIARIS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Pharmaceutical Technology, Dept. of Pharmacy, University of Patras, Rio, 26510, Greece

<sup>2</sup>Vardinoyiannion Eye Institute, University of Crete Medical School, Heraklion, Crete, Greece

*Stability of protein-encapsulating DRV (dried-rehydrated vesicle) liposomes is evaluated after freeze-drying vesicles in presence (or not) of trehalose. Two proteins, bovine serum albumin (BSA) and tissue-type plasminogen activator (t-PA), are used, and protein-encapsulating liposomes with different lipid compositions are prepared by DRV technique. Encapsulation efficiencies are calculated, after measuring BSA with a fluorescence technique and t-PA's amidolytic activity toward a chromogenic substrate.*

*Experimental results show that encapsulation of BSA in vesicles ranges between 35 and 53% of the protein and is only slightly affected by lipid composition. For t-PA, entrapment efficiencies are lower, ranging between 2 and 16%, while lipid composition has substantial effect on entrapment (cholesterol inclusion is very important). After freeze-drying, some lipid compositions remain stable, retaining most of initially entrapped proteins, while others do not, but they may be stabilized by trehalose. In the case of BSA, liposome behavior cannot be explained based on lipid membrane rigidity (more rigid=more stable). This may be connected with previously demonstrated interactions of BSA with membranes. Oppositely, t-PA behavior is more predictable, meaning that the lipid composition selected for the specific therapeutic application determines the need for cryoprotectant addition before freeze-drying t-PA containing DRV liposomes, perhaps due to the fact that under conditions applying minimum or no interactions between t-PA and lipid membranes occur.*

*Thereby, interactions between proteins and membranes determine not only the encapsulation efficiency but also the need for cryopreservation of liposomal protein formulations.*

**Keywords** liposome, freeze-drying, stability, protein retention, albumin, t-PA, BSA

Received 05 August 2006; accepted 04 September 2006.

This work is part of the master's thesis of VN.

The authors are grateful to Dr. P. Klepetsanis and Dr. V. Drakopoulos, Institute of Chemical Engineering & High Temperature Chemical Processes (FORTH/ICE-HT), Platani, Patras, Greece, for their valuable help with size and zeta-potential measurements and SEM.

Address correspondence to Sophia G. Antimisiaris, Laboratory of Pharmaceutical Technology, Dept. of Pharmacy, University of Patras, Rio 26510, Greece; Tel.: ++30-2610-969332; Fax: ++30-2610-996302; E-mail: santimis@upatras.gr

## Introduction

It is well known that DRV (dried-rehydrated vesicle) liposomes, which were developed initially by Kirby and Gregoriadis in 1984, are capable of encapsulating high amounts of aqueous soluble molecules under mild conditions (e.g., conditions that do not cause decomposition or loss of activity of active substances, such as sonication or presence of organic solvents). Thereby, the DRV method is the method of choice when liposomal formulations of sensitive active proteins or enzymes are prepared. The high entrapment ability of this type of liposome is due to the fact that preformed “empty” small unilamellar vesicles are disrupted during a freeze-drying step in the presence of the solute destined for entrapment. Subsequently, during controlled rehydration, which is carried out in the presence of a concentrated solution of the solute (to be encapsulated), the vesicles fuse into large oligolamellar vesicles entrapping high amounts of solute. Thereby, any presence of cryoprotectant during the initial freeze-drying step of DRV preparation results in reduced solute entrapment as previously proven (Zadi and Gregoriadis, 2000), due to the fact that cryoprotectant preserves the integrity of the “empty” vesicles.

In this study we investigate the effect of lipid composition on the retention of protein-encapsulating DRVs after they are freeze-dried and rehydrated in the absence and presence of different concentrations of cryoprotectant. Trehalose is used as cryoprotectant because it is known (Schiraldi et al., 2002; Madden et al., 1985; Ohtake et al., 2005) to have good cryoprotectant effects for a broad range of proteins and liposome types or lipid compositions. The effect of the specific time during DRV preparation at which the cryoprotectant is added on the final retention of proteins in the vesicles after freeze-drying is also investigated.

Initially, bovine serum albumin (BSA) is used as a model protein, and the effect of several parameters (lipid membrane composition, concentration of trehalose, time of addition of trehalose) on the stability (retention of BSA) of the DRV liposomes is evaluated. Based on the conclusions drawn from the BSA experiments, selected lipid compositions of t-PA-encapsulating liposomes are prepared. Finally, the retention of t-PA (amidolytic) activity in the dried liposomes is evaluated and conclusions are extracted, by comparing the results obtained for the two different proteins.

The objective of this study is to determine which factors are important for the preparation of protein-encapsulating liposomes in dry form, in order to prepare t-PA-encapsulating DRV liposomes with long shelf life. t-PA, in solution or liposomal form, is currently being investigated for thrombolytic activity in appropriate animal models of retinal thrombosis (Christodoulakis et al., 2004, 2005).

## Materials and Methods

### *Materials*

Phospholipids: PC (phosphatidylcholine), DMPC (di-myristoylglycero-PC), DPPC (dipalmitoylglycero-PC), DSPC (di-stearoylglycero-PC), and PG (phosphatidylglycerol) were purchased from Lipid Products (Nutfield, UK) and Avanti Lipids (USA). All phospholipids used were tested by TLC and were found to be pure. Cholesterol (99%) [Chol] was purchased from Sigma-Aldrich Hellas (Athens, Greece). Tissue plasminogen activator (t-PA) (Actilyse) was purchased by Boehringer Ingelheim, Germany. BSA, triton X-100, trehalose, and all other chemicals used were of analytical quality and were purchased by Sigma-Aldrich Hellas (Athens, Greece). The chromogenic substrate H-D-isoleucyl-L-propyl-L-arginine-p-nitroaniline dihydrochloride (S-2288) was from Chromogenix (Instrumentation



Laboratory SpA, Milan, Italy) and was purchased from Labomed S.A., Athens, Greece. A Shimadzu RF 1501 spectrofluorimeter equipped with a thermostated cuvette holder was used for the measurement of BSA concentration. A Shimadzu 1240 spectrophotometer, equipped with a thermostated cuvette holder (with magnetic stirring capability) and a program to measure  $\Delta(\text{Abs})/\text{min}$ , was used for the measurement of the activity of t-PA.

### ***Liposome Compositions Used and Preparation***

DRV liposomes encapsulating BSA or t-PA were prepared. The following lipid compositions were used: PC, PC:Chol (2:1), PC:PG:Chol (9:1:5), DMPC, DMPC:PG:Chol (9:1:5), DPPC:Chol (1:1), DPPC:PG:Chol (9:1:5), DSPC and DSPC:Chol (1:1).

For all types of liposomes the thin-film hydration method was initially used for preparation of empty MLV (multilamellar vesicle) and SUV (small unilamellar vesicle) liposomes. Lipids or mixtures of lipids (13  $\mu\text{mol}$ ) were solvated in a chloroform/methanol (2:1) solution and then evaporated until a thin film formed on the walls of a 50-ml round-bottom flask. Residual organic solvents were removed by nitrogen, and the film was hydrated with TBS, pH 7.40. After this SUV liposomes were prepared by probe sonication and 1 ml of SUV dispersion (after it was centrifuged to remove aggregates and titanium particles) was mixed with 1 ml of a BSA solution (1 mg/ml) or 0.5 ml of a t-PA solution (1 mg/ml). The mixture was freeze-dried and then rehydrated with a controlled stepwise protocol.

Annealing of structural defects followed, by incubation of liposome dispersions for 1 h at a temperature above the lipid  $T_m$ , and separation of liposome-encapsulated protein from free protein was accomplished by centrifugation at 10,000 rpm for 40 min, at least two times.

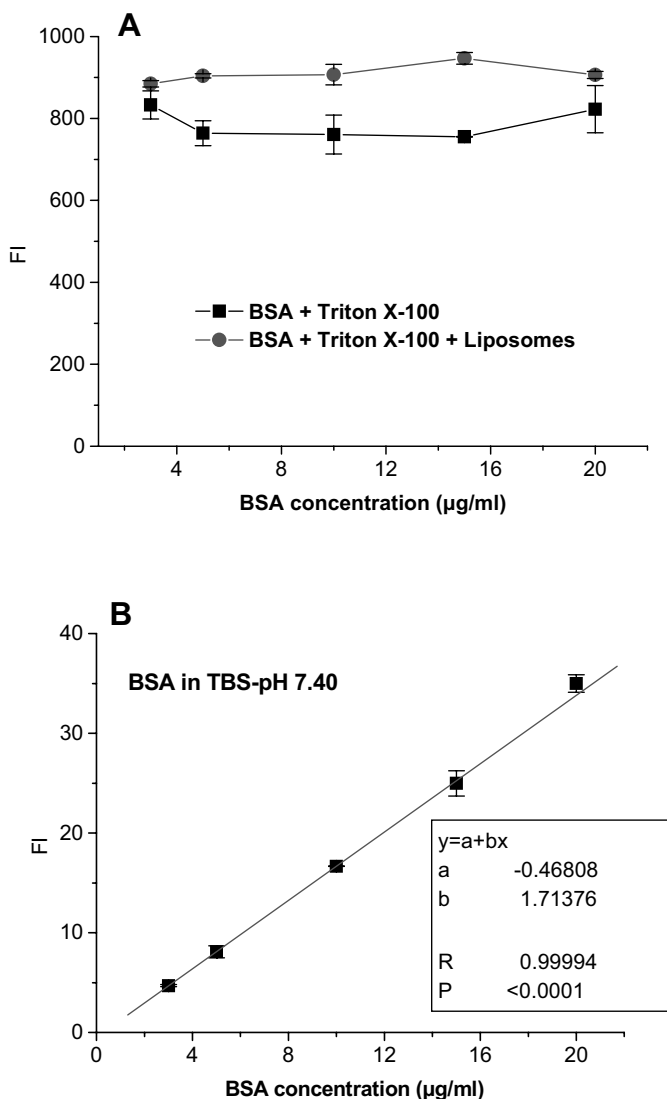
In some cases, trehalose was added during preparation of the DRV liposomes, in order to have trehalose in the interior of the DRV liposomes. The details of these cases will be discussed below.

### ***Measurement of Vesicle Entrapment Efficiency***

The amount of protein entrapped in the liposomes prepared was measured routinely before and after the freeze-drying step. For calculation of vesicle entrapment efficiency, the concentration of protein, as well as lipid content of the liposomes were measured after liposomes were separated from non-entrapped materials. Phospholipid concentration was measured by a colorimetric assay (Stewart, 1980). Details about protein concentration measurements follow.

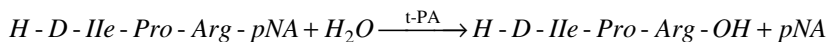
*For BSA.* Measurement of BSA concentration in liposomes was carried out by a fluorescence method, reported previously (Gümüřdereliođlu and Kesgin, 2005). According to this, the fluorescence intensity of BSA solutions (excitation wavelength 280 nm; emission wavelength 332 nm, slit-slit: 10–10, high sensitivity) is linear at concentrations between 3 and 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Initially it was attempted to apply this method for measuring BSA in the liposome fractions, after disrupting the liposomes with Triton X-100; however, this was not possible due to interference from triton (as presented in Fig. 1A). Thereby, it was decided to measure the non-entrapped BSA (in buffer, according to the calibration curve presented in Fig. 1B) and calculate entrapment by subtracting the non-entrapped fraction from the initial quantity of BSA added in liposomes.

*For t-PA.* For the measurement of t-PA concentration in liposomes, a serine protease specific substrate is utilized. The method is based on the fact that t-PA is a serine protease,



**Figure 1.** A representative correlation curve for BSA in TBS buffer pH 7.4, in the range 3 to 30 µg/ml, when clean solutions are measured (A), or in presence of Triton X-100 (1% v/v final concentration) containing or not disrupted empty liposomes (B). Each value is the mean of three measurements (three different solutions), and bars represent standard deviation of the mean.

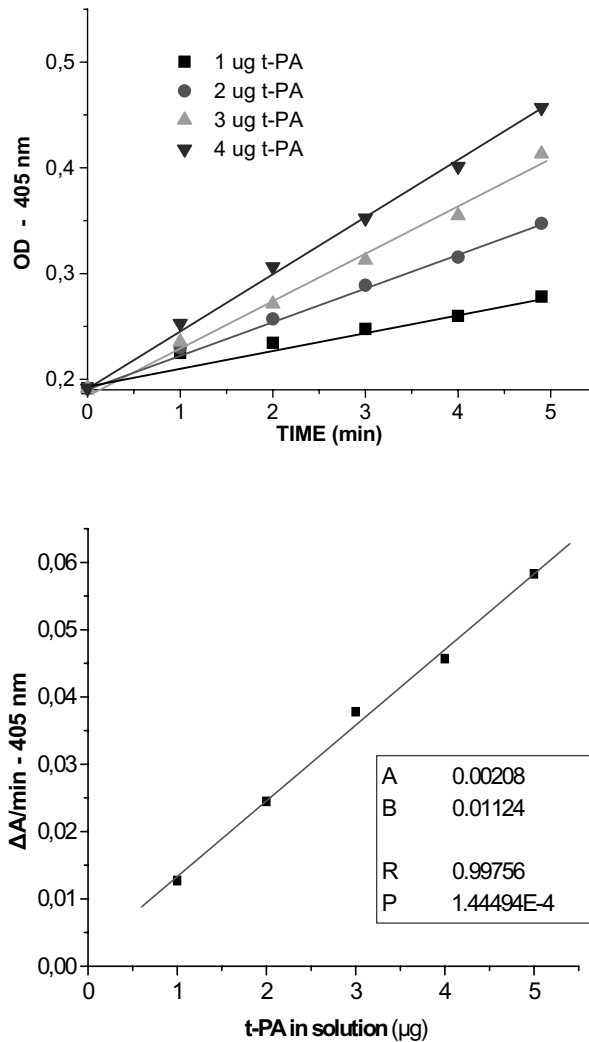
which activates plasminogen by splitting a single Arg-Val bond of the plasminogen molecule. In purified systems these enzymes have been shown to hydrolyze tripeptide chromogenic substrates (Friberger, 1982). t-PA activity is thus determined by the rate at which p-nitroaniline (pNA) is released. The formation of pNA can be followed spectrophotometrically at 405 nm by a recorder. The correlation between the change in absorbance per minute ( $\Delta A/\text{min}$ ) and t-PA activity is linear in the 3 to 30 U/l range.



Initially it was established that this method is linear in the presence of triton-solubilized liposomes (as presented in Fig. 2). The presence of triton and solubilized lipids (from liposomes) was seen to have an effect on the calibration curve characteristics; thereby standard solutions were always measured in presence of the appropriate amounts of triton and lipid (from empty liposomes).

### *Freeze-Drying of Liposomes—Cases Studied*

For the evaluation of DRV liposome stability after freeze-drying, different protocols/cases are evaluated:



**Figure 2.** A representative correlation curve for the measurement of t-PA in liposomes. In standard solutions the appropriate concentration of t-PA is added (from Actilyse solution) in presence of Triton X-100 (1% v/v final concentration) and disrupted empty liposomes, in Tris buffer, pH 8.4.

*Case 1: Addition of trehalose only in the exterior (dispersion media) of liposomes.* After DRV's are prepared and washed from non-encapsulated protein, they are redispersed in buffer in the presence of varying concentrations of trehalose (30, 100, 200, 400 mM) or no trehalose (control).

*Case 2: Addition of trehalose in the interior (entrapped aqueous phases) and exterior of the liposomes.* In this case two sub-cases were evaluated: *Case 2.1.* Trehalose is included in the buffer used during the rehydration step of the DRV technique at a concentration of 1 mg/ml (2.6 mM) or 0.5 mg/ml (1.3 mM). *Case 2.2.* Trehalose is included in the DRV rehydration buffer (as above) at high concentrations (30, 100, 200, 400 mM), compared with case 2.1. In some cases, the SUV liposomes prepared initially (during DRV preparation) were dispersed in H<sub>2</sub>O instead of buffer, and thus the final NaCl concentration in DRV liposomes was 140 mM (instead of 280 mM, when SUVs were prepared in buffer).

### ***Physicochemical and Morphological Characterization of Liposomes***

Vesicle size distribution and  $\zeta$ -potential is evaluated in some cases. For this, 50  $\mu$ l of liposome dispersion is diluted with 20 ml of filtered buffer (0.22  $\mu$ m pore size, polycarbonate filters, Millipore, UK) and sized immediately by photon correlation spectroscopy (Malvern Instruments, Model 4700C), which enabled the mass distribution of particle size to be obtained. Measurements are performed at 25°C with a fixed angle of 90° and sizes quoted are the z-average mean (dz) for the liposomal hydrodynamic diameter. The size of liposomes is also confirmed by scanning electron microscopy (SEM) observation.

For  $\zeta$ -potential measurement, liposome dispersions are diluted with PBS pH 7.40 and their electrophoretic mobility is measured at 25°C (Zetasizer 5000 Malvern Instruments, UK). Zeta potentials of the dispersions are calculated (by the instrument) from the Smoluchowski equation.

## **Results**

### ***Physicochemical Characteristics and Encapsulation Efficiency of the Liposomes Prepared***

The mean diameters and  $\zeta$ -potential values of BSA-containing liposomes before and after freeze-drying (in absence or presence of 100 mM trehalose) are presented in Table 1. Vesicle mean diameters were very high, compared to what is usually measured for DRV liposomes (ranging between 300 to 350 nm [Fatouros et al., 2001] and 473 $\pm$ 39 nm [Kallinteri et al., 2004]); however, in all cases the vesicle sizes had good distribution around the mean value, and uniformity values measured were high but acceptable for non-extruded vesicles. After freeze-drying, in all cases studied, vesicle size decreases significantly. For t-PA liposomes the mean diameter distribution was measured only for the PC/PG/Chol liposomes and found to range between 455 and 620 nm (before freeze-drying), significantly lower than the same liposomes with BSA but close to the values measured previously for other drugs (mentioned above).

From the  $\zeta$ -potential measurements (Table 1) it is seen that initial surface charge was substantially high for the liposomes that contain charged lipid (PG) in their membrane, as expected. After freeze-drying, especially when trehalose is present, the  $\zeta$ -potential of PC/PG/Chol liposomes is lowered (significant difference between initial value and value measured after FD in trehalose), implying that the vesicle surface has changed, perhaps due to

**Table 1**

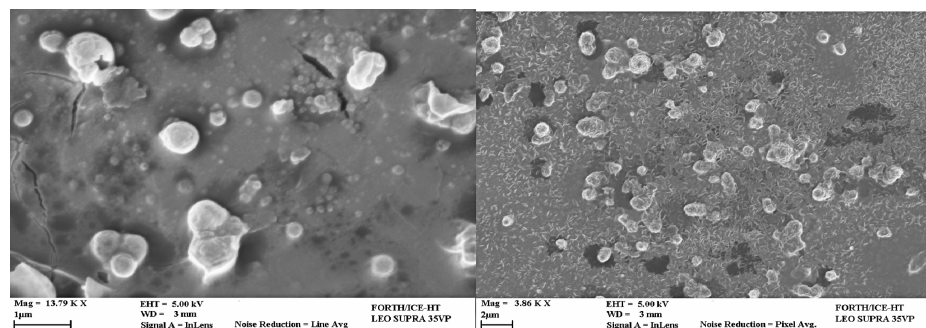
Mean diameters (in  $\mu\text{m}$ ) and zeta-potential values measured for BSA containing DRV liposomes after preparation and after freeze-drying in absence or presence of 100 mM trehalose in their dispersion media. Each value is the mean from 3 (size) or 5 (zeta-potential) measurements from at least two different samples

Liposome lipid composition	Mean diameter ( $\mu\text{m}$ ) $D(n,05)$ [uniformity]	Zeta potential (mV)
<i>Before freeze-drying</i>		
PC	2.89 [0.543]	$-2.6 \pm 0.7$
DSPC/Chol	4.30 [0.554]	$-2.9 \pm 0.3$
PC/PG/Chol	3.32 [0.515]	$-20.2 \pm 0.9$
<i>After freeze-drying (no trehalose added—control)</i>		
PC	2.16 [0.445]	$-1.6 \pm 0.7$
DSPC/Chol	2.58 [0.499]	$-2.1 \pm 0.7$
PC/PG/Chol	2.76 [0.435]	$-19.1 \pm 0.8$
<i>After freeze-drying (in presence of 100 mM trehalose externally)</i>		
PC	1.48 [0.354]	$-2.9 \pm 0.8$
DSPC/Chol	3.23 [0.458]	$-3.5 \pm 1.2$
PC/PG/Chol	1.74 [0.366]	$-17.4 \pm 0.7$

trehalose adsorption. In all other cases the surface charge of the vesicles was very low and differences between the vesicles after freeze-drying (in absence or presence of trehalose) were not statistically significant (at  $p=.05$ ); however, the slight differences observed imply that the vesicle surface has been modified.

The sizes measured for t-PA-containing DRV liposomes were confirmed by SEM observation of some samples as seen in Fig. 3. The smaller size of empty DRV liposomes (compared to BSA-containing ones) prepared by the same method is also proven.

The encapsulation efficiencies for BSA and t-PA, for the various cases of DRVs prepared, are presented in Table 2. It is obvious that encapsulation of BSA (between 35 and 53%) was profoundly higher compared to t-PA (between 2 and 15%). This may be connected



**Figure 3.** Representative scanning electron microscopy (SEM) micrographs of empty and t-PA-containing PC/PG/Chol DRV liposomes (left- and right-hand pictures, respectively). The bar is equal to 1  $\mu\text{m}$  for the left-side picture and 2  $\mu\text{m}$  for the right-side picture.

**Table 2**

Trapping efficiencies for BSA or t-PA in DRV liposomes with different lipid membrane compositions. In all cases, trapping was calculated after measuring both protein and lipid and reference was the initial ratio of protein/lipid

Lipid composition	BSA trapping efficiency (%)
PC	34.5 ± 1.6
PC:CHOL (2:1)	42.4 ± 1.5
PC:PG:CHOL (9:1:5)	52.6 ± 1.7
DMPC	35.27 ± 0.51
DMPC:PG:CHOL (9:1:5)	45.9 ± 2.7
DPPC:CHOL (1:1)	45.4 ± 2.5
DPPC:PG:CHOL (9:1:5)	38.51 ± 0.91
DSPC:CHOL (1:1)	51.11 ± 0.98
Lipid composition	t-PA trapping efficiency (%)
PC	9.1 ± 1.5
PC:PG:CHOL (9:1:5)	14.86 ± 0.63
DMPC	2.17 ± 0.03
DSPC	8.0 ± 1.1
DSPC:PG:CHOL (9:1:5)	10.28 ± 0.16

with the demonstrated interactions between lipid membranes and BSA (Tsunoda et al., 2001; Yokouchi et al., 2001) that result in adsorption and/or partition of BSA molecules in lipid membranes. The larger sizes measured for the BSA-containing liposomes are in agreement with this explanation.

For both cases of proteins, trapping was low in the least rigid DMPC liposomes, compared with most other lipid compositions studied. However, in the case of BSA, the values measured for DMPC and PC liposomes were not significantly different, perhaps due to specific interactions between BSA and lipids.

Considering the results for t-PA, we should mention that in previous experiments (Christodoulakis et al., 2004, 2005) when investigating the encapsulation of t-PA in DRV liposomes, it was demonstrated that for three different lipid compositions (PC/Chol, DSPC/Chol, and PC/PG/Chol), t-PA encapsulation was practically the same. Thus, inclusion of charge on the liposome membrane (by adding 10% PG in the lipid layer) did not seem to have an effect on enzyme encapsulation. However, encapsulation was found to increase up to 11.2±2.1%, when lower t-PA/lipid molar ratios were used for liposome preparation, as also demonstrated previously by others (Heeremans et al., 1995). Thereby, for the t-PA liposomes prepared herein, we decided to use the same low initial protein/lipid analogy and check additional lipid compositions (PC, DSPC, DSPC/PG/Chol, DMPC). By comparing the present results (Table 2) with the encapsulation efficiencies calculated earlier for t-PA under identical conditions (Christodoulakis et al., 2004, 2005), it is evident that they are well correlated. Additionally, the present results reveal an important effect of membrane rigidity on t-PA entrapment efficiency (case of DMPC and comparison between plain PC or DSPC and cholesterol-containing liposomes). In all cases, t-PA entrapment increases when cholesterol is added in the liposome membrane.

It should be mentioned at this point that the encapsulation efficiencies for t-PA entrapment in DRV liposomes calculated herein were significantly lower compared to previous values determined by Heeremans et al. (1995) (between 30 and 80%). Perhaps this is due to the fact that different liposome preparation techniques and conditions were used. In this later study it was concluded that high encapsulation of t-PA can be achieved by selecting the proper milieu for inducing a strong interaction between t-PA and bilayer. However, since the scope of the present study was not to prepare liposomes with the highest possible encapsulation but to study their cryopreservation, and since BSA interacts with bilayers under the conditions applying and (most possibly) t-PA does not, we preferred to continue our study under these conditions, in order to compare the two different cases.

### ***Retention of Proteins in DRV Liposomes after Freeze-Drying***

The retention values of BSA or t-PA in the DRV liposomes after freeze-drying (in absence or presence of increasing concentrations of trehalose) are presented in Table 3. In all cases, retention was calculated as percent of protein retained (from the amount initially entrapped). These results show that freeze-drying in the presence of trehalose does not always result in an increase of protein retention. Furthermore, in the case of BSA, the stability of DRV liposomes (retention of BSA) after freeze-drying is not always correlated with the lipid membrane rigidity. Indeed, plain PC liposomes (as well as PC/Chol) were found to be very stable (they retain approximately 70% of BSA) and DSPC/Chol liposomes were less stable (they retain 62% of BSA). Furthermore, the liposomes that retain high amounts of BSA after freeze-drying in the absence of cryoprotectant were destabilized (retain less protein) when freeze-dried in the presence of increasing amounts of trehalose. Only formulations that are less stable after freeze-drying in the absence of cryoprotectant (DMPC and PC/PG/Chol) could be stabilized (retain more BSA) when freeze-dried in the presence of trehalose (30, 100, or 200 mM). This anomalous behavior of BSA-encapsulating liposomes prompted us to study some of the two different groups of lipid compositions with t-PA, since t-PA probably does not interact with lipid membranes (under the conditions applying), as mentioned earlier. As observed (Table 3), the results in the case of t-PA were more or less expectable. Indeed, the least stable PC and PC/PG/Chol liposomes retained lower amounts of protein after freeze-drying in the absence of cryoprotectant, but they were considerably stabilized (protein retention increased) if freeze-dried in the presence of trehalose (100 to 200 mM). On the other hand, the very rigid DSPC and DSPC/Chol formulations were very stable and thereby do not need cryopreservation during freeze-drying. These results prove that the behavior of t-PA-encapsulating DRV liposomes is different compared to BSA-containing liposomes, possibly due to the fact that no interaction between t-PA and lipid membranes is taking place.

### ***Effect on Protein Retention of Adding Trehalose inside DRV Liposomes before FD***

In some cases, in order to evaluate the effect of adding trehalose in the interior aqueous compartments (in addition to the dispersion media) of the DRVs, liposomes were prepared in the presence of trehalose (added during the rehydration step of the DRV technique) (case 2 in § 2.4). This was decided because when trehalose was added in the system during MLV preparation, very low (close to zero) protein encapsulation in the DRVs was achieved. Therefore, the preparation of trehalose and BSA-containing liposomes was initially attempted by adding low amounts of trehalose (at trehalose/lipid molar ratios of 0.1 and 0.2) during the rehydration step of the DRV preparation method. The results of this set

**Table 3**

Retention of BSA or t-PA in DRV liposomes with various lipid membrane compositions after freeze-drying. Protein retention is presented as percent of the initial percent of protein remaining encapsulated. In all cases, protein encapsulation was measured as amount protein/mg of lipid

Lipid composition (n=3)	Retention of BSA (%)				
	No treh	30 mM	100 mM	200 mM	400 mM
PC	69.5 ± 1.8	50.9 ± 2.9	38.7 ± 6.5	20.4 ± 5.2	0
PC:CHOL(2:1)	72.8 ± 2.8	63.9 ± 3.1	46.3 ± 5.4	43.9 ± 8.1	24.3 ± 3.4
Treh/PC=0.2*	72.4 ± 1.3*	60.8 ± 2.7*	52.5 ± 4.1*	35.2 ± 2.3*	36.4 ± 5.7*
PC:PG:CHOL(9:1:5)	19.4 ± 7.6	38.8 ± 4.4	55.3 ± 3.6	55.9 ± 3.6	51.4 ± 3.9
DMPC	0	72.4 ± 1.3	60.7 ± 1.7	35.7 ± 8.1	0
DMPC:PG:CHOL(9:1:5)	66.9 ± 5.9	49.5 ± 9.7	34.3 ± 3.2	15.7 ± 6.6	0
DPPC:CHOL(1:1)	63.9 ± 5.1	53.2 ± 7.7	57.81 ± 0.60	55.2 ± 3.6	44.13 ± .41
DPPC:PG:CHOL(9:1:5)	79.8 ± 1.1	72.5 ± 2.1	56.8 ± 1.5	41.5 ± 3.9	0
DSPC:CHOL(1:1)	62.4 ± 2.9	76.9 ± 3.0	74.7 ± 4.5	62.4 ± 4.4	60.3 ± 6.4

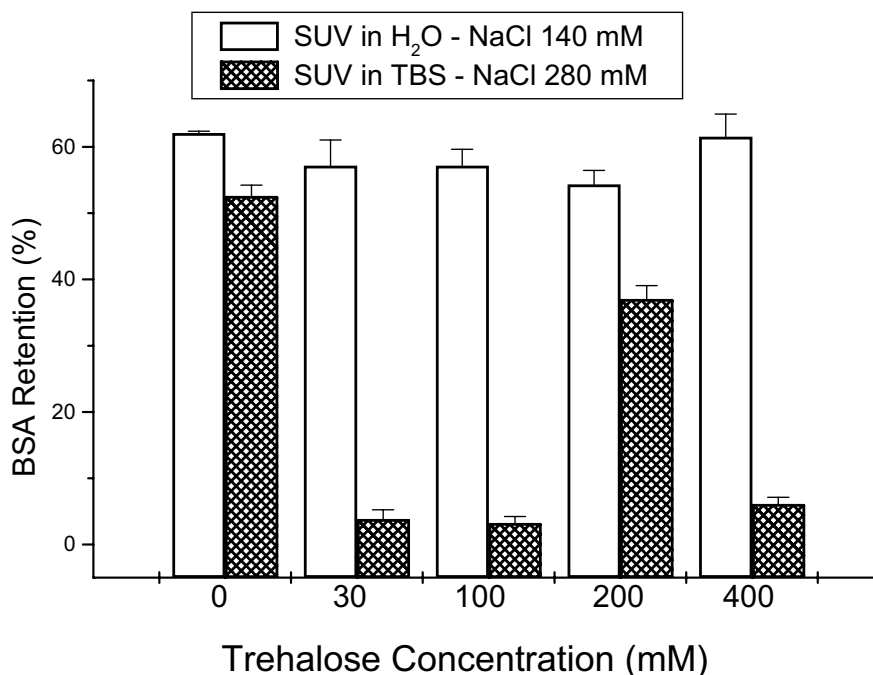
  

Lipid Composition (n=3)	Retention of t-PA (%)				
	No treh	30 mM	100 mM	200 mM	400 mM
PC	32.7 ± 1.3	44.7 ± 3.9	77.3 ± 64.2	24.0 ± 1.2	27.1 ± 1.3
PC:PG:CHOL (9:1:5)	31.4 ± 1.7	67.3 ± 5.4	67.5 ± 4.5	75.8 ± 4.6	59.5 ± 9.5
DSPC	100	100	74.0 ± 8.2	—	—
DSPC:CHOL (1:1)	100	75.7 ± 1.8	83.4 ± 5.8	—	—

\*Trehalose is also added in vesicle interior as described in paragraph 2.4 (case 2.1).

of experiments did not show any increase in liposome stability (for BSA retention) (only one result shown in Table 3). After this, in order to increase the amount of trehalose encapsulated inside the liposomes, higher concentrations of trehalose were included in the DRV rehydration buffer (case 2.2, paragraph 2.4). In this set of experiments the effect of NaCl final concentration in the DRVs on the BSA trapping efficiency and stability after freeze-drying was also investigated. This last study was carried out because the very high trehalose concentrations would cause osmotic pressure differences between the two sides of the liposome membranes. As seen in Fig. 4, if salt concentration of the liposomes is decreased, trehalose could be encapsulated at any concentration (in the range between 30 and 400 mM) without resulting in a decrease of BSA encapsulation in the DRVs. Thereby, using these preparations, the effect of adding trehalose on both sides of liposomes on their stability during freeze-drying (in comparison with adding trehalose only in the vesicle dispersion media) was evaluated. The results of this final experiment (Table 4) revealed that a slight improvement of the stability of BSA-encapsulating DRV liposomes could be achieved. However, when the best result of this case (64% retention of BSA after freeze-drying in the presence of 100 mM trehalose) are compared with the best results of the case presented for the same liposomes in Table 2 (55.3 to 55.9% retention), it is noticed that the difference in terms of amount of BSA retained is slight but statistically significant (at  $p=.05$ ).





**Figure 4.** BSA retention (percent of initially entrapped) in PC/PG/Chol DRV liposomes that were freeze-dried in the presence of various concentrations of trehalose (or not), added both, in the interior and dispersion media of the liposomes, as described in detail under “Materials and Methods” section. In one case (white bars) the SUV liposomes initially prepared were hydrated with plain H<sub>2</sub>O (final NaCl concentration in DRV is 140 mM), and in the second (patterned bars) with buffer TBS (final NaCl concentration in DRV is 280 mM).

**Table 4**

Retention of BSA in PC/PG/Chol (9:1:5) DRV liposomes prepared according to case 2.2 (in section 2.4) in presence of 140 mM NaCl and various concentrations of trehalose added only in the exterior of vesicles (EXT) or in both exterior and interior (EXT-INT), after freeze-drying. Each result is the mean of three different experiments ( $\pm SD$ )

Trehalose concentration (mM)	BSA retention (%)	
	EXT	EXT-INT
0	10.2 $\pm$ 3.5	
30	51.4 $\pm$ 5.4	59.4 $\pm$ 2.2
100	48.3 $\pm$ 5.5	64.0 $\pm$ 3.2
200	33.3 $\pm$ 6.3	48.3 $\pm$ 7.9
400	34.8 $\pm$ 5.1	53.2 $\pm$ 5.2

## Discussion

The cryopreservation of protein-encapsulating DRV liposomes was studied. Liposomes encapsulating BSA or t-PA, with different lipid compositions, were prepared using the DRV method, and the retention of the proteins in the vesicles was measured after the vesicles were freeze-dried. Since the DRV method uses a freeze-drying cycle for solute entrapment and thus trehalose (which is used as cryoprotectant) could not be co-entrapped in the vesicles during their initial preparation, the introduction of trehalose in the DRV liposomes at different stages of their preparation was attempted.

The results of this study show that trapping efficiency for BSA is a lot higher compared with t-PA, in all cases. This is most probably a consequence of BSA molecule adsorption and/or penetration on/in the phospholipid bilayer (Colletier et al., 2002), which is known to vary according to liposome lipid composition (Tsunoda et al., 2001; Yokouchi et al., 2001). For t-PA, trapping efficiency in vesicles is correlated with the vesicle stability expected by their lipid composition, indicating that interactions—as the ones between BSA and lipid membranes—do not occur. The smaller sizes measured for t-PA-containing DRV liposomes compared to the BSA-containing ones are in agreement with this hypothesis. Indeed, the sizes of t-PA-encapsulating DRVs are close to the sizes previously measured with other drugs (Fatouros et al., 2001; Kallinteri et al., 2004) while BSA-incorporating DRVs are much larger, indicating that some protein molecules penetrate in the lipid bilayer.

For the effect of freeze-drying on protein retention in vesicles, results for t-PA demonstrate that as the rigidity of the lipid membrane increases, its integrity (and thus retention of protein) during freeze-drying (without trehalose) increases as well. For very rigid liposomes composed of DSPC or DSPC/Chol, addition of trehalose is not needed, since all the vesicle-associated protein remains entrapped. On the other hand, less stable preparations, such as PC or PC/PG/Chol liposomes, can retain higher amounts of t-PA if they are freeze-dried in the presence of 100 to 200 mM trehalose (compared to the protein retained when freeze-dried without cryoprotectant).

For BSA, the behavior of the DRV liposomes was different for the different lipid compositions tested. Only two of the vesicle types prepared (DMPC and PC/PG/Chol) retained more BSA when freeze-drying was carried out in the presence of trehalose (compared to retention after freeze-drying without trehalose). For all the other preparations studied, a rather anomalous behavior was demonstrated. Indeed, even very leaky PC liposomes demonstrated relatively high stability ( $69.5 \pm 1.8$  BSA retention) after freeze-drying without trehalose, while vesicle stability was negatively affected if trehalose was present during freeze-drying. This can be explained if we consider that the presence of trehalose during the freeze-drying process brings about membrane hydrophobic defects that may affect protein accommodation within the bilayer (Bakas, 2000). In other words, trehalose may be somehow resulting in “displacement” of BSA molecules from the vesicle bilayers. And since interaction of BSA with liposome membranes has been demonstrated to be affected by the lipid composition of the membrane, this may explain why some lipid compositions are negatively affected by trehalose presence (during freeze-drying) and others are not.

It was attempted to evaluate if the retention of BSA in some liposome types after freeze-drying in the absence or presence of trehalose can be somehow correlated with the mean diameter or  $\zeta$ -potential of the vesicles (Table 1). From the  $\zeta$ -potential results, we cannot extract valuable information, since the differences between different cases (initial value or after freeze-drying) were slight and not significant. Vesicle size was reduced in

all cases after freeze-drying. This is in good agreement with the explanation given for the larger size of BSA-DRV liposomes (compared to t-PA ones), or else this proves that BSA is associated with the vesicle lipid membranes (as BSA molecules are released from liposomes, their size decreases). Additionally, when comparing the size results (Table 1) with the BSA retention results (Table 3) for PC and DSPC/Chol liposomes, we see that as size decreases, BSA retention also decreases. However, for PC/PG/Chol liposomes the size results are not fully correlated with BSA retention, perhaps due to the presence of a charged lipid (PG) on the liposome bilayer.

For PC/PG/Chol DRV liposomes, stability after freeze-drying can be further increased by including trehalose in the interior of the vesicles (during their preparation-rehydration step) after adjusting the osmolarity of the buffers used at the various stages of their preparation and freeze-drying (Table 4). This implies that the presence of cryoprotectant on both sides of the bilayers results in better cryopreservation of the vesicles, perhaps due to the preservation of the inner bilayers of the DRV liposomes.

Summarizing, we conclude that different proteins, depending on their properties and affinity to interact with membranes (under the conditions applying), demonstrate different behavior when encapsulated in DRV liposomes in respect to encapsulation efficiency and retention after freeze-drying (in presence or not of cryoprotectant). Thereby, in each case the appropriate conditions for the preservation of the specific protein liposomal formulation should be explored. Perhaps a simple adsorption test as performed by others (Yokouchi et al., 2001) may help predict if protein-membrane interaction is taking place, in which case the stability of the liposomes after freeze-drying may not be well correlated with the rigidity of the lipid membrane.

## References

- Bakas, L. (2000). Influence of encapsulated enzyme on the surface properties of freeze-dried liposomes in trehalose. *Coll. Surf. B: Biointerfaces* 17:103–109.
- Christodoulakis, E. V., Antimisiaris, S., Grigoryan, E. N., Naoumidi, I. I., Maniadi, V., Tsilimbaris, M. K. (2005). Intravitreal injection of tPA entrapped in liposomes, in experimental retinal vein thrombosis. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 46(Suppl. S):4038.
- Christodoulakis, E. V., Antimisiaris, S., Naoumidi, I. I., Panteleontidis, V. A., Skondra, D. I. X., Pallikaris, I. G., Tsilimbaris, M. K. (2004). t-PA encapsulation in liposomes for extravascular administration in venous thrombosis. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 45(Suppl. 2):5223.
- Colletier, J. P., Chaize, B., Winterhalter, M., Fournier, D. (2002). Protein encapsulation in liposomes: Efficiency depends on interactions between protein and phospholipids bilayer. *BMC Biotechnol.* 2:9–16.
- Fatouros, D., Haztidimitriou, K., Antimisiaris, S. G. (2001). Liposomes encapsulating prednisolone and prednisolone-cyclodextrin complexes: Comparison of membrane integrity and drug release. *Eur. J. Pharm. Sci.* 13:287–296.
- Friberger, P. (1982). Chromogenic peptide substrates. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 42(Suppl. 162):57–58.
- Gümüşderelioğlu, M., Kesgin, D. (2005). Release kinetics of bovine serum albumin from pH-sensitive poly(vinyl ether) based hydrogels. *Int. J. Pharm.* 288:273–279.
- Heeremans, J. L., Gerritsen, H. R., Meusen, S. P., Mijnheer, F. W., Gangaram Panday, R. S., Prevost, R., Klufft, C., Crommelin, D. J. (1995). The preparation of tissue-type Plasminogen Activator (t-PA) containing liposomes: Entrapment efficiency and ultracentrifugation damage. *J. Drug Targeting* 3:301–310.
- Kallinteri, P., Fatouros, D., Klepetsanis, P., Antimisiaris, S. G. (2004). Arsenic trioxide liposomes: Encapsulation efficiency and in vitro stability. *J. Liposome Res.* 14:27–38.

- Kirby, C., Gregoriadis, G. (1984). Dehydration-rehydration vesicles: A simple method for high-yield drug entrapment in liposomes. *Biotechnology* 2:979–984.
- Madden, T. D., Bally, M., Hope, M., Cullis, P. R., Schieren, H. P., Janoff, A. S. (1985). Protection of large unilamellar vesicles by trehalose during dehydration: Retention of vesicle contents. *Biochim. Biophys. Acta* 817:67–74.
- Ohtake, S., Schebor, C., Palecek, S. P., De Pablo, J. J. (2005). Phase behavior of freeze-dried phospholipids-cholesterol mixtures stabilized with trehalose. *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes* 1713:57–64.
- Schiraldi, C., Di Lernia, I., De Rosa, M. (2002). Trehalose production: Exploiting novel approaches. *TRENDS Biotechnol.* 20:420–425.
- Stewart, J. C. M. (1980). Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal. Biochem.* 104:10–14.
- Tsunoda, T., Imura, T., Kadota, M., Yamazaki, T., Yamauchi, H., Kwon, K. O., Yokoyama, S., Sakai, H., Abe, M. (2001). Effect of lysozyme and bovine serum albumin on membrane characteristics of dipalmitoylphosphatidylglycerol liposomes. *Coll. Surf. B: Biointerfaces* 20:155–163.
- Yokouchi, Y., Tsunoda, T., Imura, T., Yamauchi, H., Yokoyama, S., Sakai, H., Abe, M. (2001). Effect of adsorption of bovine serum albumin on liposomal membrane characteristics. *Coll. Surf. B: Biointerfaces* 20:95–103.
- Zadi, B., Gregoriadis, G. (2000). A novel method for high-yield entrapment of solute into small liposomes. *J. Lipos. Res.* 10:73–80.

----- Προωθημένο μήνυμα από OSLI-PRS@slackinc.com -----

Ημερομηνία: Fri, 4 Jan 2008 22:30:33 -0500

Από: OSLI-PRS@slackinc.com

Απάντηση-Προς: OSLI-PRS@slackinc.com

Θέμα: Manuscript OSLI-2007-002 Version 1

Προς: tsilimb@med.uoc.gr

Miltiades K. Tsilimbaris, MD  
Hospital of Heraklion University  
Dpt of Ophthalmology  
Heraklion 711 10  
Greece

RE: OSLI-2007-002 Version 1

Title: Post-vitrectomy t-PA injection for central retinal vein occlusion:  
brief report.

Dear Dr. Tsilimbaris:

I am pleased that we will be able to publish your manuscript, referenced  
above, in Ophthalmic Surgery, Lasers & Imaging.

You will receive page proofs before publication. Please ensure that these  
will be reviewed and responded to promptly. Although we try to avoid  
changes thereafter, we reserve the right to edit for style, clarity, and length  
prior to final publication. Complimentary copies of the journal, along with a  
form to order reprints, will be sent to you following publication.

Thank you for this opportunity.

Sincerely yours,

Carmen A. Puliafito, M.D.  
Editor-in-Chief

----- Τέλος προωθημένου μηνύματος -----

--

University of Crete  
Faculty of Medicine  
Web-based E-mail Service

Author 1

Name: Emmanouil Christodoulakis  
Retina Service, Ophthalmology Clinic, Heraklion University  
Affiliation: Hospital  
Email Address: mchristod@gmail.com

Author 2

Name: Miltiades Tsilimbaris  
Affiliation: Hospital of Heraklion University  
Email Address: tsilimb@med.uoc.gr

Title:

**Post-vitrectomy t-PA injection for central retinal vein occlusion: brief report**

Journal Name:

**Ophthalmic Surgery, Lasers & Imaging**

**ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ – ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ  
ΣΕ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

1. 2nd RETINA - MACULA - VITREOUS HIPPOCRATIC SYMPOSIUM.  
September, 20-21, 2002. Intercontinental Hotel, Athens, Greece,  
SATURDAY, SEPTEMBER 21, 2002 13:00 –14:45  
M. Tsilimbaris, M. Christodoulakis, V. Panteleontidis, I.G. Pallikaris.  
Extravascular in situ thrombolytic application for the management of retinal  
vein thrombosis (15 min). (Abstract Book: abstract 45, page: 77).
2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44: E-Abstract 4054. 2003 ARVO 4054—  
B757. Extravascular in situ Thrombolytic (r-TPA) Application for the  
Management of Retinal Vein Thrombosis- Short Term Results.  
Christodoulakis EV, Tsilimbaris MK, Panteleontidis VA, Pallikaris IG.
3. AEGEAN RETINA VIII, JULY 11-13, 2003, SANTORINI, GREECE.  
(Abstract Book page 37). Extravascular Application of Thrombolytic Agent  
(R-Tpa) for the Management of Retinal Vein Thrombosis – Our Experience.  
Christodoulakis EV, Tsilimbaris MK, Panteleontidis VA, Pallikaris IG.
4. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45: E-Abstract 5223. 2004 ARVO 5223—  
B547. t-PA encapsulation in liposomes for extravascular administration in  
venous thrombosis. E.V. Christodoulakis, S.A. Antimisiaris, I.I. Naoumidi,  
V.A. Panteleontidis, D.I. X. Skondra, I.G. Pallikaris and M.K. Tsilimbaris
5. Στρογγυλή Τράπεζα: Σύγχρονες απόψεις για την αντιμετώπιση των  
φλεβικών θρομβώσεων. Ομιλία με θέμα: Έρευνα και κλινική πράξη – Που  
βρισκόμαστε με τη Θεραπεία της φλεβικής θρόμβωσης; Ημερίδα της  
Ελληνικής ομοσπονδίας Οφθαλμολογικών Εταιριών. 27 Νοεμβρίου 2004.  
Θεσσαλονίκη.

6. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46: E-Abstract 4038. 2005 ARVO 4038—B396. Intravitreal Injection of tPA Entrapped in Liposomes, in Experimental Retinal Vein Photothrombosis. E.V. Christodoulakis, S.A. Antimisiaris, E.N. Grigoryan, I.I. Naoumidi, V. Maniadi and M.K. Tsilimbaris.
  
7. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47: E-Abstract 5168. 2006 ARVO 5168—B583. The Role of Intravitreal t-PA, in an Experimental Model of Retinal Vein Thrombosis. E.V. Christodoulakis, S. Antimisiaris, E. Grigoryan, S. Harisis and M.K. Tsilimbaris.
  
8. TOD 41 ULUSAL CONGRESI, 30 Ekim–2 Kasim 2007, Antalya, Turkey 2-11-2007, 09:30 – 11:00, PNL-TUR-YUN. EV Christodoulakis: T-PA for retinal occlusive disease: Clinical and experimental approach. (Programm Book page 38).



## **2. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

**Η εργασία πραγματοποιήθηκε στο Φαρμακευτικό Τμήμα το Πανεπιστημίου της Πάτρας, υπεύθ. Αναπλ. Καθηγ. Σοφία Αντιμησιάρη. Η παρασκευή των λιποσωμάτων, έγινε από τον δρ. Σπυρίδων Μουρτά**

## 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1 Όργανα και υλικά

#### 2.1.1 Όργανα

- pH-μετρο WTW pH 522
- Υδατόλουτρο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας JULABO FS 18
- Ακίδα Υπερήχων (Probe Sonicator) Sonics Vibra Cell
- Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης JEOL JSM - 35
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας Mettler AE 166, Deltarange®
- Θερμαινόμενη πλάκα Labinco L32
- Λουτρό Υπερήχων (Ultrasonic Cleaner), trade Raypa®, R. Espinar, S.L.
- Μαγνητικός αναδευτήρας IKAMAG® RH JANKE & KUNKEL
- Μηχανικός αναδευτήρας (vortex) A-100 Micrel
- Περιστρεφόμενος Εξατμιστήρας (Rotary Evaporator) BÜCHI RE 111
- Συσκευή λυοφιλοποίησης FREEZE DRYER LABCONCO 4.5
- Φασματοφωτόμετρο (Spectrophotometer UV-VIS) Shimadzu UV – 1205
- Φασματοφωτόμετρο (Spectrophotometer UV-VIS) Shimadzu UV–mini 1240
- Φθορισμόμετρο Shimadzu RF-1501
- Φυγόκεντρος Biofuge 28 RS (HERAEUS SEPATECH)

#### 2.1.2 Υλικά:

➤ Λιπίδια σε μορφή σκόνης:

- Φωσφατιδυλοχολίνη (Egg PC): (Lipoid), 100 mg/mL
- Φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG): (Lipoid ) 10 mg/mL.
- Διστεαροϋλογλυκεροφωσφατιδυλοχολίνη (DSPC): (Avanti Polar Lipids), 20 mg/mL.

Διαλύματα αυτών των λιπιδίων προετοιμάστηκαν με διάλυσή τους σε οργανικό διαλύτη χλωροφόρμιο στις ανάλογες τελικές συγκεντρώσεις. Τα διαλύματα των λιπιδίων φυλάσσονται στην κατάψυξη στους -20°C.

➤ Χοληστερόλη (Cholesterol) 99% σε στερεή μορφή. Προμηθεύεται από την εταιρία SIGMA. Παρασκευάστηκε και χρησιμοποιήθηκε διάλυμα χοληστερόλης σε

χλωροφόρμιο συγκέντρωσης 20 mg/mL. Το διάλυμα χοληστερόλης φυλάσσεται επίσης στην κατάψυξη (-20°C).

➤ Υγρό άζωτο για την ψύξη των λιποσωμάτων πριν τη λυοφιλοποίηση

#### 2.1.2.1 Παρασκευή διαλυμάτων

a) Ρυθμιστικό διάλυμα Tris pH 8.4, που παρασκευάζεται με διάλυση των ακόλουθων συστατικών:

12.1 g Tris (Tris [hydroxymethyl] aminomethane) (SIGMA)

6.2 g NaCl (Sodium Chloride) (Merck)

0.02% NaN<sub>3</sub> (Sodium Azide) 99% Aldrich

σε 1 L απεσταγμένο νερό (D-H<sub>2</sub>O), και το pH ρυθμίζεται στο 8.4 με διάλυμα 37% HCl (Merck). Το διάλυμα φυλάσσεται στο ψυγείο στους 4°C.

b) Ρυθμιστικό διάλυμα Tris pH 8, που παρασκευάζεται με διάλυση των ακόλουθων συστατικών:

12.1 g Tris (Tris [hydroxymethyl] aminomethane) (SIGMA)

6.2 g NaCl (Sodium Chloride) (Merck)

0.02% NaN<sub>3</sub> (Sodium Azide) 99% Aldrich

σε 1 L απεσταγμένο νερό (D-H<sub>2</sub>O), και το pH ρυθμίζεται στο 8 με διάλυμα 37% HCl (Merck). Το διάλυμα φυλάσσεται στο ψυγείο στους 4°C.

#### 2.1.2.2 Μέτρηση λιπιδίου – Υλικά

Χρησιμοποιήθηκαν:

α) Χλωροφόρμιο (CHCl<sub>3</sub>) από την εταιρία χημικών MERCK.

β) Διάλυμα Stewart, που παρασκευάζεται με διάλυση:

27.03 g FeCl<sub>3</sub>·6 H<sub>2</sub>O (Iron (III) chloride hexahydrate) της Merck και

30.4 g NH<sub>4</sub>SCN (Ammonium thiocyanate) (Merck) σε 1 L D - H<sub>2</sub>O

Το διάλυμα είναι σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου για αρκετούς μήνες. Πρέπει να φυλάσσεται σε σκιερό μέρος.

#### 2.1.2.3 Προσδιορισμός ενεργότητας του t-PA - Υλικά:

α) 1 φιαλίδιο t-PA (Actilyse MW=68000, μιας αλυσίδας) 50mg σε κόνι και 1 φιαλίδιο με 50 mL ενέσιμο ύδωρ, τα οποία προμηθεύονται από την εταιρία Boehringer

Ingelheim. Τα φιαλίδια διατηρούνται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Η κόνις διαλύεται στο ενέσιμο ύδωρ δίνοντας συγκέντρωση 1000ppm. Το διάλυμα πρέπει επίσης να φυλάσσεται στην κατάψυξη στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- β) Υπόστρωμα (S-2288<sup>TM</sup>, MW=577.6) υπό τη μορφή κόνεως, το οποίο περιέχει 25mg υποστρώματος και 40mg μαννιτόλη ως αραιωτικό. Προμηθεύεται από την εταιρία Chromogenix. Το στερεό διατηρείται σταθερό σε θερμοκρασία  $2-8^{\circ}\text{C}$  μέχρι την ημερομηνία λήξης του. Μετά την ανασύσταση σε ενέσιμο ύδωρ είναι σταθερό για περίπου 2 μήνες σε θερμοκρασία  $2-8^{\circ}\text{C}$ . Απαιτείται προσοχή στους χειρισμούς διότι σε περίπτωση μόλυνσης υφίσταται υδρόλυση. Η ανασύσταση πραγματοποιείται με 8.65 mL ενέσιμου ύδατος ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 5mmol/L.
- γ) Υγρό απόθεμα triton-X 100 (SIGMA). Ποσότητα του triton αραιώνεται κατάλληλα με ρυθμιστικό διάλυμα pH 8.4 μέχρι τελική συγκέντρωση (w/w) 20%.

## 2.2 Μέθοδοι

### 2.2.1 Προσδιορισμός λιπιδίου-Μέθοδος Stewart (Anal.Biochemica, 1980)

Η μέθοδος Stewart χρησιμοποιείται προκειμένου να προσδιοριστεί η ακριβής συγκέντρωση του λιπιδίου στα λιποσωμικά δείγματα. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα των φωσφολιπιδίων να σχηματίζουν σύμπλοκο με το σιδηροθειοκυανιούχο αμμώνιο σε οργανικό διάλυμα. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι η παρουσία ανόργανου φωσφόρου δεν παρεμποδίζει την ανάλυση. Η συσχέτιση των τιμών απορρόφησης με τα  $\mu\text{g}$  του φωσφολιπιδίου πραγματοποιείται με εύκολο τρόπο. Προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων και των δειγμάτων: Φτιάχνουμε 10 mL διαλύματος φωσφολιπιδίου PC (από δ/μα αρχικής συγκέντρωσης 20mg/mL) σε χλωροφόρμιο σε συγκέντρωση 0.1 mg/mL.

#### Αναλυτική μέθοδος:

- i. Ετοιμάζουμε τα πρότυπα διαλύματα σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 10mL όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 2.3).
- ii. Στη συνέχεια, ανακινούμε ισχυρά τα δείγματα με vortex επί 1min
- iii. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στις 5000 rpm ή αφήνουμε τα δείγματα σε ηρεμία ώστε να διαχωριστούν οι φάσεις (περίπου 10-15 min)
- iv. Αφαιρούμε προσεκτικά την υπερκείμενη υδατική φάση με τη βοήθεια αντλίας κενού και μετράμε οπτική απορρόφηση του λιπιδίου στα 485nm.

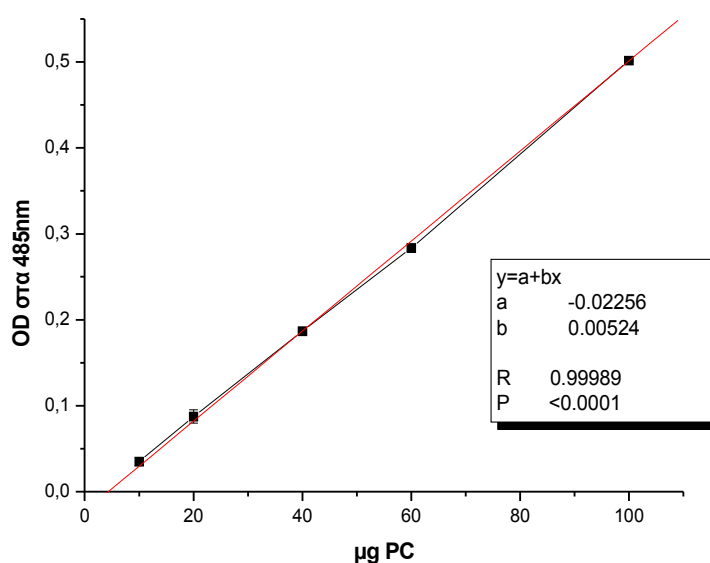
Πίνακας 2.1: Διαλύματα για πρότυπη καμπύλη Stewart

Δείγμα	Ποσότητα λιπιδίου ( $\mu\text{g}$ )	Πρότυπο διάλυμα λιπιδίου (mL)	Χλωροφόρμιο (mL)	Σιδηροθειοκυανιούχο 0.1 M (mL)
1	10	0.1	1.9	2.0
2	20	0.2	1.8	2.0
3	40	0.4	1.6	2.0
4	60	0.6	1.4	2.0
5	100	1.0	1.0	2.0

Μέτρηση OD:

- i. Ανοίγουμε το UV/VIS φασματοφωτόμετρο
- ii. Ρυθμίζουμε το μήκος κύματος στα 485 nm
- iii. Μηδενίζουμε με χλωροφόρμιο (τυφλό)
- iv. Μετράμε τα δείγματα ξεκινώντας από το αραιότερο στο πυκνότερο
- v. Βάσει της καμπύλης αναφοράς που προκύπτει, υπολογίζεται η ποσότητα ( $\mu\text{g}$ ) και τελικώς η συγκέντρωση του λιπιδίου ( $\text{mg/mL}$ ) στο δείγμα εργασίας.

Με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω υπολογίστηκε η συγκέντρωση του λιπιδίου στα αρχικά δείγματα. Σε ποσότητα του λιποσωμικού εναιωρήματος (20 $\mu\text{l}$ ) προστέθηκαν 2mL  $\text{CHCl}_3$  και 2 mL αντιδραστηρίου Stewart. Όπου χρειάστηκε, το δείγμα αραιώθηκε κατάλληλα.

Διάγραμμα 2.1 : Πρότυπη καμπύλη STEWART λιπιδίου σε  $\text{CHCl}_3$  στα 485nm

### 2.2.2. Πειράματα παρασκευής DRV λιποσωμάτων που εγκλωβίζουν t-PA

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων αυτών χρησιμοποιήθηκε μητρικό διάλυμα t-PA 1000 ppm. Τα λιπίδια που χρησιμοποιήθηκαν και οι αντίστοιχες λιποσωμικές συστάσεις φαίνονται στον πίνακα 2.2.

Η πειραματική διαδικασία μοιάζει με αυτήν που ακολουθήσαμε στην περίπτωση της αλβουμίνης (Ntimenou et al, 2006; Διατριβή ΜΔΕ Βασιλικής Ντυμένου, Πάτρα 2005). Παρακάτω περιγράφονται τα σημεία που της πορείας

#### **Παρασκευή DRV λιποσωμάτων**

DRV μέθοδος: Είναι η μέθοδος εκλογής για την παρασκευή λιποσωμάτων που εγκλωβίζουν ευαίσθητα πρωτεϊνικά μόρια. Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στη μέθοδο “Gregoriadis-Kirby” που περιλαμβάνει: Λυοφιλοποίηση μίγματος διασποράς προσχηματισμένων άδειων λιποσωμάτων και της υπό εγκλωβισμό ουσίας και επακόλουθη ελεγχόμενη ενυδάτωση. Τα λιποσώματα που λαμβάνονται αναμένονται να είναι ολιγοστοιβαδικά και ανομοιογενή από άποψη διασποράς μεγέθους. **Πορεία παρασκευής:**

#### ▪ *Παρασκευή MLV:*

Παρασκευάστηκαν μεγάλα πολυστοιβαδικά λιποσώματα (MLV) με τη μέθοδο ενυδάτωσης λεπτού υμενίου. Αυτή περιλαμβάνει εξάτμιση υπό κενό του διαλύτη (χλωροφόρμιο) των λιπιδίων μέσα σε σφαιρική φιάλη (των 100mL). Η διαδικασία αυτή πρέπει να λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία πάνω από τη θερμοκρασία μετάπτωσης ( $T_c$ ) του εκάστοτε χρησιμοποιούμενου λιπιδίου (π.χ. για DSPC  $>60^\circ\text{C}$ ).

Στη συνέχεια, διαβιβάστηκε αέριο άζωτο στο παραχθέν φιλμ ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα οργανικού διαλύτη και ακολούθησε ενυδάτωση με 10mL ρυθμιστικό διάλυμα TBS pH 8.4. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση (vortex), εμφύσηση σε υδατόλουτρο και λουτρό υπερήχων εναλλάξ ώστε να διασπαρεί πλήρως το λιπίδιο σχηματίζοντας MLV.

#### ▪ *Παρασκευή SUV:*

Παρασκευάστηκαν μικρά μονοστοιβαδικά λιποσώματα (SUV) με την τοποθέτηση του δείγματος σε ακίδα υπερήχων (Sonics-vibra cell) για περίπου 20 min.

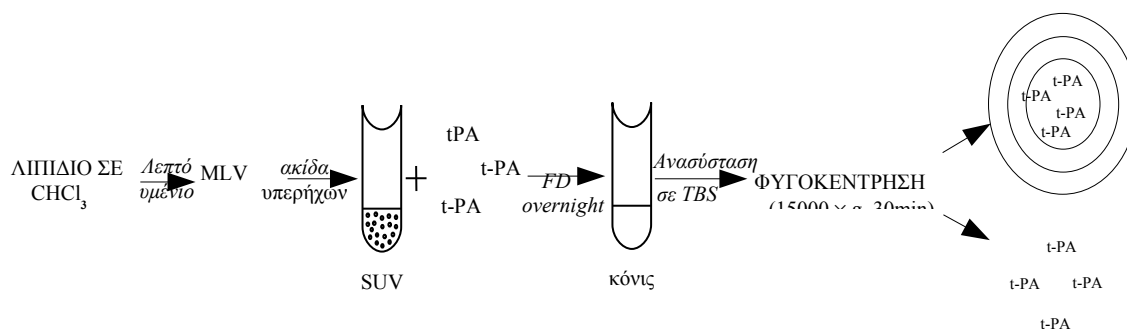
Τα λιποσώματα που δεν περιείχαν χοληστερόλη είχαν το χαρακτηριστικό της πλήρους διαύγειας μετά τη μείωση του μεγέθους τους. Αντίθετα, τα «σκληρά» DSPC:CHOL=1:1 και DSPC:CHOL=1:1 εμφάνιζαν μεγαλύτερη θολερότητα. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 15000 x g για 10 min περίπου ώστε να απομακρυνθεί το τιτάνιο και τυχόν συσσωματώματα MLV λιποσωμάτων.

▪ *Λυοφιλοποίηση :*

Το λιποσωμικό εναιώρημα χωρίστηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες ως εξής: 1mL SUV λιποσώματος (10mg/mL) αναμίχθηκε με 0.5 mL διαλύματος t\_PA. Τα δείγματα καταψύχθηκαν με υγρό άζωτο και τοποθετήθηκαν για λυοφιλοποίηση (Labconco freeze-drier 4.5) όλο το βράδυ.

▪ *Παρασκευή DRV:*

Μετά τη λυοφιλοποίηση τα δείγματα είναι υπό μορφή κόνεως (powder). Η ανασύσταση πραγματοποιήθηκε με προσθήκη όσο το δυνατόν μικρότερου όγκου TBS (50μl), ισχυρή ανάδευση (vortex) και ηρεμία σε θερμοκρασία >Tc για 30min. Ακολούθησε προσθήκη ίσου όγκου TBS και επανάληψη της διαδικασίας. Τα δύο αυτά βήματα είναι και τα πιο σημαντικά στην παρασκευή των DRV καθώς αποτελούν τα στάδια στα οποία η αλβουμίνη εγκλωβίζεται στα λιποσώματα. Το εναιώρημα συμπληρώθηκε μέχρι το 1mL με TBS.



**Εικόνα 2.1 :** Σχηματική απεικόνιση παρασκευής DRV λιποσωμάτων

▪ *Διαχωρισμός εγκλωβισμένης-μη εγκλωβισμένης πρωτεΐνης:*

Η t-PA που εγκλωβίστηκε στα λιποσώματα, διαχωρίστηκε από τη μη εγκλωβισμένη με φυγοκέντρηση στις 15000 στροφές για 30min στους 25°C (Biofuge



28 RS). Τα δείγματα ενώθηκαν και χωρίστηκαν σε δύο φυγοκεντρικούς σωλήνες. Τα λιποσώματα λόγω διαφοράς πυκνότητας καταβυθίζονται, ενώ η ελεύθερη t-PA παραμένει στο υπερκείμενο κλάσμα. Το λιποσωμικό δείγμα (ίζημα) καθαρίστηκε δυο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα TBS μέσω φυγοκέντρησης, όπως παραπάνω. Τα υπερκείμενα κλάσματα από τις φυγοκεντρήσεις συλλέχθηκαν και ενώθηκαν. Τέλος, τα λιποσώματα επαναιωρήθηκαν με τη βοήθεια ανάδευσης (vortex) στον αρχικό όγκο με ρυθμιστικό διάλυμα TBS

**Πίνακας 2.2:** Λιπίδια και λιποσωμικές συστάσεις που χρησιμοποιήθηκαν

Λιποσωμική Σύσταση (10mg/mL)	Λιπιδική σύσταση	MW	mmol	mg
PC:PG:CHOL 9:1:5	PC	760	0.118	90
	PG	760	0.013	10
	CHOL	386,7	0.065	25.14
PC	PC	760	0.13	100
DSPC	DSPC	790.15	0.127	100
DSPC:PG:CHOL 9:1:5	DSPC	790.15	0.114	90
	PG	760	0.013	10
	CHOL	386,7	0.065	25.14

### 2.2.3. Μέτρηση ενεργότητας t-PA—Υπολογισμός εγκλωβισμού πρωτεΐνης

#### Θεωρητικό υπόβαθρο-Χρωμοφόρα υποστρώματα (chromogenic substrates)

Οι μετρήσεις που πραγματοποιούνται με τη βοήθεια χρωμοφόρων υποστρωμάτων αντανακλούν την ενζυμική ενεργότητα. Τα συνθετικά υποστρώματα είναι πολύ ευαίσθητα, δηλ. μπορούν να ανιχνεύουν πολύ χαμηλές ενζυμικές ενεργότητες. Επίσης, είναι λιγότερο εκλεκτικά σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσικά υποστρώματα. Υπάρχουν ορισμένοι παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο όταν χρησιμοποιείται ένα χρωμοφόρο υπόστρωμα. Αυτοί είναι:

*Παρεμποδίζοντα ένζυμα:* Αν στο δείγμα που πρόκειται να μετρηθεί συνυπάρχουν κι άλλα ένζυμα που μπορεί να αντιδρούν με το ίδιο υπόστρωμα, πρέπει να αφαιρεθεί η ενεργότητά τους.

*Θερμοκρασία:* Ο ρυθμός με τον οποίο διασπάται το υπόστρωμα εξαρτάται σημαντικά από τη θερμοκρασία. Συνεπώς, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε σε ποιες θερμοκρασίες είναι εφαρμόσιμη μια συγκεκριμένη μέθοδος (θερμοκρασία περιβάλλοντος, 25, 30 ή 37 °C. Αύξηση της θερμοκρασίας κατά 1 °C προκαλεί αύξηση

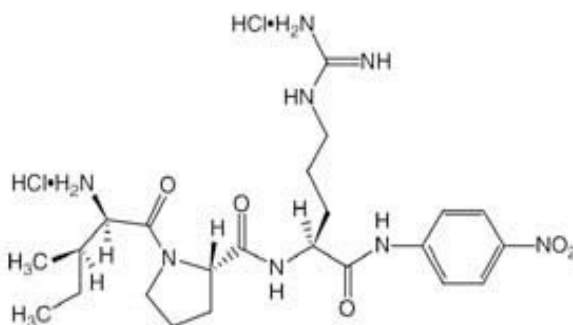
της ταχύτητας της αντίδρασης κατά 2.5-7.5%. Γι' αυτό το λόγο η θερμοκρασία πρέπει να παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια της μέτρησης και τα πειράματα να εκτελούνται στην ίδια θερμοκρασία.

*pH:* Η  $K_m$  και η  $k_{cat}$  εξαρτώνται από το pH. Αυτό σημαίνει ότι οι υπολογισμοί για την κινητική του ενζύμου πρέπει να γίνουν μόνο από αποτελέσματα που λήφθηκαν στο ίδιο pH.

*Ρυθμιστικά διαλύματα:* Συνήθως, χρησιμοποιείται Tris-HCl. Η pKa του Tris ρυθμιστικού διαλύματος είναι 8.1 (25 °C), γεγονός που το καθιστά κατάλληλο για μετρήσεις σε τιμές pH μεταξύ 7.3 - 9.3, όπου οι περισσότερες σερινοπρωτεάσες δείχνουν μέγιστη ενεργότητα.

### Υπόστρωμα S-2288

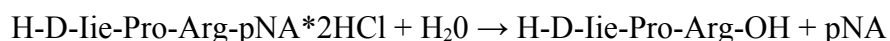
Οι πρωτεάσες με εξειδίκευση στην αργινίνη υδρολύουν εύκολα το υπόστρωμα H-D-Iie-Pro-Arg-pNA (S-2288).



**Εικόνα 2.2:** Χημική δομή υποστρώματος S-2288

Το t-PA (ενεργοποιητής πλασμινογόνου ιστικού τύπου) είναι μια σερινοπρωτεάση η οποία ενεργοποιεί το πλασμινογόνο διασπώντας έναν απλό δεσμό του πλασμινογόνου, μεταξύ Arg-Val. Αυτά τα ένζυμα έχουν δείξει ότι υδρολύουν υποστρώματα αποτελούμενα από τριπεπίδια. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην υδρόλυση του υποστρώματος από το ένζυμο (t-PA), η οποία οδηγεί στο σχηματισμό έγχρωμου προϊόντος (pNA). Η αντίδραση η οποία λαμβάνει χώρα είναι η εξής:

t-PA



Έτσι, η ενεργότητα του t-PA καθορίζεται από το ρυθμό με τον οποίο απελευθερώνεται η p-νιτροανιλίνη (pNA). Ο ρυθμός σχηματισμού της pNA μπορεί να καταγραφεί με φασματοφωτόμετρο στα 405 nm.

Η συσχέτιση ανάμεσα στη μεταβολή απορρόφησης ανά λεπτό ( $\Delta A/\text{min}$ ) και στην αμιδολυτική ενεργότητα είναι συνήθως γραμμική σε εύρος 0.05-0.5  $\mu\text{kat/l}$  ή σε 3-30 U/l. Όταν αυτό είναι δυνατό πρέπει να ελέγχεται η γραμμικότητα της μεθόδου για κάθε ανεξάρτητο τύπο δείγματος. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με σταδιακή αραιώση του δείγματος. Η αμιδολυτική ενεργότητα δε συμπίπτει απαραίτητα με την ινωδολυτική ενεργότητα για διάφορα δείγματα t-PA.

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας (και συνεπώς του αρχικού εγκλωβισμού) του t-PA στα λιποσώματα πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο UV/VIS Shimadzu UV-1205 το οποίο είναι συνδεδεμένο με υδατόλουτρο JULABO FS 18 σε σταθερή θερμοκρασία 37°C. Η πειραματική διαδικασία προσδιορισμού περιελάμβανε σύγκριση της ενεργότητας με βάση πρότυπο διάλυμα γνωστής ενεργότητας. Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης για το t-PA, 100 $\mu\text{l}$  από το μητρικό διάλυμα t-PA 1000 $\text{rpm}$  αραιώθηκαν με Tris pH 8.4 σε ογκομετρική φιάλη των 10mL προς τελική συγκέντρωση 0.01mg/mL (solution A). Το διάλυμα αυτό διατηρείται για λίγες μέρες στους 4°C. Από το διάλυμα αυτό με αντίστοιχες αραιώσεις προέκυψαν τα επιμέρους πρότυπα διαλύματα (πίνακας 2.5). Κάθε δείγμα επαναλαμβάνεται εις διπλούν.

#### Προετοιμασία των δειγμάτων:

- i. Κατάλληλος όγκος του sol A αραιώθηκε με Tris pH 8.4 και προστέθηκε triton.(Η προσθήκη του triton είναι απαραίτητη για να αποφευχθεί η προσρόφηση στις μεμβράνες). Συνιστάται τελική συγκέντρωση w/v 1%.
- ii. Ακολούθησε μηχανική ανάδευση (vortex) και τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση στους 37°C περίπου για 10 min.
- iii. Προστέθηκαν 200 $\mu\text{l}$  υποστρώματος (που επίσης επώαστηκε στους 37°C)

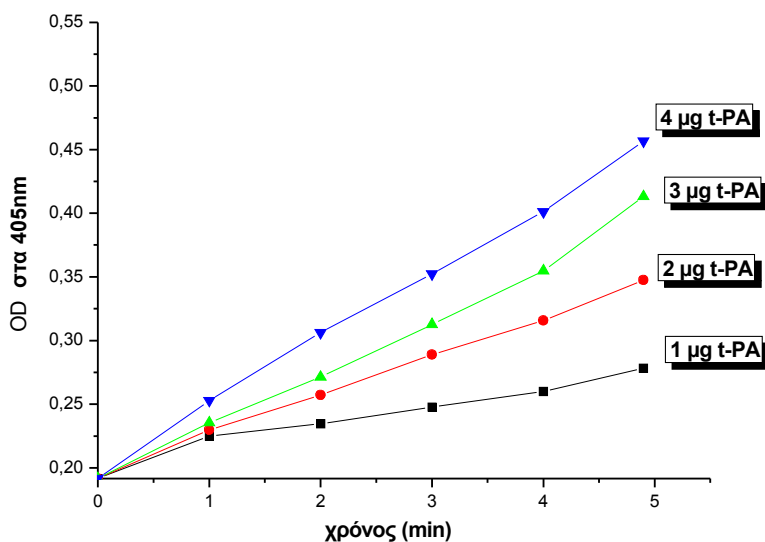
**Πίνακας 2.3:** Διαλύματα για πρότυπη καμπύλη t-PA

Δείγμα	$\mu\text{g t-PA}$	sol A ( $\mu\text{l}$ ) 10 $\mu\text{g/mL}$	Triton-X 20%	Tris buffer pH 8.4	Υπόστρωμα 5 mmol/L( $\mu\text{l}$ )
1	1	100	50	450	200
2	2	200	50	350	200
3	3	300	50	250	200
4	4	400	50	150	200
5	5	500	50	50	200

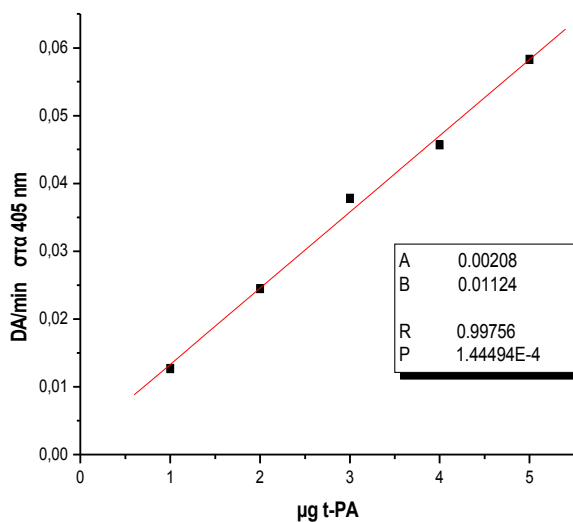
#### Μέτρηση ενεργότητας

- i. Το φασματοφωτόμετρο ρυθμίζεται στα 405 nm.
- ii. Μηδενισμός οργάνου με Tris pH 8.4

- iii. Το δείγμα τοποθετείται στο φασματοφωτόμετρο για λήψη διαγράμματος απορρόφησης με το χρόνο 0-4.9 min στα 405 nm.
- iv. Από το διάγραμμα αυτό υπολογίζεται το  $\Delta A/\text{min}$ . (διάγραμμα 2.4)
- v. Με βάση τις λαμβανόμενες τιμές κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη για το t-PA που χρησιμεύει στον υπολογισμό της ποσότητας του εγκλωβισμένου t-PA στα δείγματα.



Διάγραμμα 2.2: Διάγραμμα OD ως προς το χρόνο για πρότυπα διαλύματα t-PA στα 405 nm



Διάγραμμα 2.3: Πρότυπη καμπύλη για t-PA σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris pH 8.4 στα 405 nm

Η ενεργότητα και συνεπώς ο εγκλωβισμός του t-PA στο αρχικό λιποσωμικό δείγμα (pooled) υπολογίστηκε ως εξής:

- i. Μικρή ποσότητα από το αρχικό δείγμα (50μl) αραιώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα Tris pH 8.4 (500μl) και προστέθηκαν 50 μl triton-X 100 (20%).
- ii. Ακολούθησε μηχανική ανάδευση (vortex) και θέρμανση στους 60°C, ώστε να «σπάσουν» τα λιποσώματα και να απελευθερωθεί το εγκλωβισμένο t-PA.
- iii. Το δείγμα τοποθετήθηκε για επώαση στους 37°C περίπου για 5 min.
- iv. Προστέθηκαν 200μl υποστρώματος (στους 37°C) και το δείγμα τοποθετήθηκε αμέσως στο φασματοφωτόμετρο σε στενή κυψελίδα. Λαμβάνεται για 4,9 min διάγραμμα απορρόφησης με το χρόνο στα 405 nm..
- v. Από το διάγραμμα αυτό υπολογίζεται το ΔA/min και ανάγεται σε μg t-PA.