

На правах рукописи

БУРЦЕВ АЛЕКСАНДР АЛЕКСАНДРОВИЧ

**ФОТОРЕФРАКЦИОННАЯ КЕРАТОАБЛЯЦИЯ С ФОТОПРОТЕКЦИЕЙ
И ЭФФЕКТОМ КРОССЛИНКИНГА
(экспериментальное обоснование)**

14.01.07 – Глазные болезни

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре глазных болезней Института усовершенствования врачей ФГБУ «Национальный медико-хирургический Центр им. Н.И. Пирогова» Минздрава России

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор,
заведующий учебной частью кафедры глазных
болезней ИУВ ФГБУ «Национальный медико-
хирургический Центр имени Н.И. Пирогова»
Минздрава России

Корниловский Игорь Михайлович

Научный консультант:

доктор медицинских наук, руководитель
Центра фундаментальных и прикладных
медико-биологических проблем ФГАУ
«НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им.
акад. С.Н. Федорова» Минздрава России,
профессор кафедры глазных болезней
Московского государственного медико-
стоматологического института им. А.И.
Евдокимова

Борзенко Сергей Анатольевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор,
начальник отдела патологии рефракции,
бинокулярного зрения и офтальмоэргономики
ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней
им. Гельмгольца»

Тарутга Елена Петровна

доктор медицинских наук, профессор, главный
научный сотрудник ФГБНУ «Научно-
исследовательского института глазных
болезней»

Шелудченко Вячеслав Михайлович

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Московский медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «24» июня 2019 г. в ___ часов на заседании Диссертационного совета Д.208.014.01 при ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России по адресу: 127486, г. Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59А.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке и на сайте ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

И.А. Мушкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Большинство фоторефракционных операций сопровождаются истончением роговой оболочки. Это ослабляет её фотопротекторную функцию по защите внутриглазных структур от внешнего ультрафиолетового (УФ) излучения (Корниловский И.М., 2013-2018) и нарушает прочностные свойства (Аветисов С.Э., Бубнов И.А., Воронин Г.В. 2001-2007; Dawson D.G., 2008; Hafezi F., Seiler T., 2008; Hassan Z., Modis L. Jr., 2014).

В процессе фоторефракционной абляции стромы роговицы часть излучения трансформируется в более длинные волны, которые проникают гораздо глубже чем, аблируемый слой ткани. Данное вторичное излучение оказывает негативное влияние на кератоциты и слои стромы, прилежащие к зоне абляции. Повреждающий эффект вторичного излучения усиливается с увеличением объёма удаляемой ткани. С этих позиций заслуживают внимания исследования по фотопротекторной защите глубжележащих слоёв стромы роговицы от вторичного излучения, индуцируемого в ходе фоторефракционной абляции (Корниловский И.М., 1995-2018).

Нарушение прочностных свойств истонченной роговицы в ряде случаев может привести к возникновению индуцированной ятрогенной кератэктазии (Анисимов С.И., 2011, 2018; Бикбов М.М., 2011-2018; Иомдина Е.Н, Тарутта Е.П., 2008; Hafezi F., Kanellopoulos J., 2007-2015). С таким осложнением в первую очередь столкнулись рефракционные хирурги при выполнении операции эксимерлазерного *in situ* кератомилеза (LASIK). При ножевом и фемтолазерном способах формирования поверхностного роговичного лоскута на ножке возникает ослабление прочностных характеристик роговицы на 20-35%, и это ослабление только усиливается с увеличением объёма абляции (Шелудченко В.М., Куренкова Н.В., 2000; Celik H.U., Alagöz N., 2012; Reinstein D.Z., Archer T.J., 2013; Schmack I., Dawson D.G., 2005). Вот почему сегодня в кераторефракционной хирургии различные технологии поверхностной абляции без формирования поверхностного

лоскута рассматриваются как более щадящие с меньшим нарушением биомеханических свойств и структурных изменений в роговице (Dan Z., 2013; Reinstein D.Z., 2013).

В 1990 году профессор Т. Seiler с соавт. высказал идею укрепления ткани роговицы. Суть метода заключалась в формировании дополнительных сшивок в коллагеновых волокнах стромы, насыщенных рибофлавином при ультрафиолетовом облучении (Seiler T., Spoerl E., 1992). Традиционная технология кросслинкинга по «Дрезденскому» протоколу и её модификации нашли применение в лечении кератоконуса и эктазий роговицы различной этиологии. Эти технологии легли в основу разработки различных вариантов ускоренного кросслинкинга для профилактики кератэктазий в фоторефракционной хирургии. Однако их применение до настоящего времени не получило широкого распространения в клинической практике. Это связано с целым рядом нежелательных побочных эффектов, обусловленных УФ-облучением роговицы при кросслинкинге (Бикбов М.М., 2010-2012; Измайлова С.Б. с соавт., 2014; Корниловский И.М., 2014-2016; Малюгин Б.Э. с соавт., 2014-2016; Touboul D., Efron N., 2012; Wollensak G., Spoerl E., 2004-2015).

Процесс фоторефракционной абляции сопровождается развитием в строме роговицы оксидативного стресса, который неизбежно усиливается из-за её дополнительного УФ-облучения при кросслинкинге. Также стоит отметить, что процедура кросслинкинга коллагена роговицы по стандартному протоколу противопоказана при значениях показателей кератопахиметрии менее 400 мкм. И поскольку истончение центральных отделов роговицы является ключевым признаком у пациентов после фоторефракционных операций, а также патогенетическим фактором механизма возникновения кератэктазий, роговицы с толщиной менее 400 мкм далеко не редкость. Таким образом, данный критерий заметно сужает круг пациентов, которые могли бы быть пролечены с применением стандартного протокола кросслинкинга и его комбинацией с фоторефракционной абляцией.

Всё вышеизложенное указывает на актуальность научных исследований по оптимизации фоторефракционной абляции с сохранением или минимизацией нарушений фотопротекторных и прочностных свойств истончённой роговой оболочки.

Цель исследования – разработать и дать экспериментальное обоснование технологии фоторефракционной кератоабляции с фотопротекцией и эффектом кросслинкинга.

Задачи исследования

1. Разработать в экспериментах *ex vivo* и *in vivo* методику фоторефракционной кератэктомии с фотопротекцией и эффектом кросслинкинга.

2. Дать клиническую оценку состоянию роговицы и определить наличие фотопротекторного эффекта при фотоабляции с рибофлавином в экспериментах *in vivo*.

3. В экспериментах *ex vivo* и *in vivo* провести тензиометрическую оценку упруго-прочностных свойств роговицы, а также оценить влияние фотосенсибилизатора на скорость и глубину абляции после кератэктомии с предварительным насыщением стромы изотоническим раствором рибофлавина.

4. По данным световой микроскопии проанализировать морфологические изменения после лазериндуцированного кросслинкинга при эксимерлазерной абляции роговицы без и с рибофлавином в экспериментах *in vivo*.

5. Доказать наличие эффекта лазериндуцированного кросслинкинга при фоторефракционной абляции с рибофлавином посредством трансмиссионной электронной микроскопии.

Научная новизна

1. Впервые разработана технология проведения фоторефракционной кератоабляции с фотопротекцией и эффектом кросслинкинга, предусматривающая предварительное насыщение стромы 0,25% изотоническим раствором рибофлавина.

2. Впервые в экспериментах *ex vivo* и *in vivo* посредством клинического и комплексного морфофункционального исследования выявлен фотопротекторный эффект насыщенных рибофлавином слоев стромы роговицы, основанный на блокировании индуцированного абляцией вторичного ультрафиолетового излучения с последующей защитой кератоцитов и глуболежащих структур стромы, прилежащих к зоне абляции.

3. Впервые на основании данных комплексных тензиометрических и морфофункциональных исследований доказано наличие эффекта кросслинкинга, индуцированного вторичным абляционным излучением.

4. Впервые по данным трансмиссионной электронной микроскопии показано, что после фотокератоабляции с рибофлавином в оставшихся слоях стромы происходит формирование стабильных поперечных сшивок коллагеновых волокон, которые подтверждают наличие эффекта кросслинкинга.

Практическая значимость

Впервые обоснована возможность применения вторичного эксимерлазерного излучения для щадящего варианта лазериндуцированного кросслинкинга в ходе абляции стромы роговицы, насыщенной 0,25% изотоническим раствором рибофлавина. Такой подход обеспечивает не только профилактику развития индуцированной кератэктазии, но и ослабляет оксидативный стресс роговицы после фоторефракционной абляции.

Положение, выносимое на защиту

Разработанная и обоснованная в экспериментах *ex vivo* и *in vivo* технология фоторефракционной кератоабляции, заключающаяся в предварительном насыщении стромы роговицы 0,25% изотоническим раствором рибофлавина и использовании индуцируемого в ходе абляции вторичного ультрафиолетового излучения, позволяет осуществить фотопротекцию и инициировать эффект кросслинкинга в строме роговицы в ходе фоторефракционной операции.

Внедрение в практику

По результатам экспериментальных исследований подготовлены методические рекомендации и получено разрешение этического комитета ФГБУ «НМХЦ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России для проведения клинической оценки эффективности предложенного способа. Материалы работы по фотопротекции и кросслинкингу в лазерной рефракционной хирургии роговицы включены в лекционный материал при обучении интернов и ординаторов, а также на курсах повышения квалификации в Институте усовершенствования врачей ФГБУ «НМХЦ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на V Международной научно-практической конференции по офтальмохирургии «Восток-Запад – 2014» (Уфа, 2014); на XVI Всероссийской конференции с международным участием «Современные технологии катарактальной и рефракционной хирургии» (Москва, 2015); Межкафедральном заседании ИУВ ФГБУ «НМХЦ им. Н.И. Пирогова» (Москва, 2017); на XIX Всероссийской конференции с международным участием «Современные технологии катарактальной и рефракционной хирургии» (Москва, 2018).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, из них 2 – в зарубежной печати, 6 – в рекомендуемых ВАК РФ изданиях, 3 имеют международную индексацию в Pubmed. Получен 1 патент РФ на изобретение.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 122 страницах машинописного текста, иллюстрирована 8 таблицами, 26 рисунками. Работа состоит из введения, 4 глав, включающих обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, а также заключения, выводов, практических рекомендаций и

библиографического указателя. Список литературы включает 271 источник, из них 96 – русскоязычных и 175 – иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Основой данного исследования явилось предложение использовать вторичное УФ-излучение, возникающее в результате рассеивания монохроматического 193 нм лазерного излучения в глубжележащих слоях стромы роговицы в ходе фоторефракционной абляции, для разработки методики лазериндуцированного кросслинкинга с последующей оценкой его эффективности, выявлением фотопротекторного эффекта и комплексным морфофункциональным исследованием посредством световой и трансмиссионной электронной микроскопии.

Дизайн исследования основан на плане проведения экспериментальных исследований эффективности метода лазериндуцированного кросслинкинга при эксимерлазерной абляции роговицы с последующим анализом полученных результатов (таблица 1).

Таблица 1 – Дизайн исследования

Исследования	Описание групп экспериментальных животных
<p>1. Исследование влияния лазериндуцированного кросслинкинга на функциональное состояние роговицы и особенности клинического течения в послеоперационном периоде в экспериментах <i>in vivo</i> (n = 32)</p>	<p>Группа 1.1 – 16 глаз 16 кроликов после трансФРК на глубину 100 мкм без и с предварительным насыщением стромы рибофлавином: подгруппа 1.1А – 8 глаз 8 кроликов после трансФРК с предварительным насыщением рибофлавином; подгруппа 1.1Б – 8 глаз 8 кроликов после трансФРК без насыщения рибофлавином.</p> <p>Группа 1.2 – 16 глаз 16 кроликов после трансФРК на глубину 50 мкм без и с предварительным насыщением стромы рибофлавином: подгруппа 1.2А – 8 глаз 8 кроликов после трансФРК с предварительным насыщением рибофлавином; подгруппа 1.2Б – 8 глаз 8 кроликов после трансФРК без насыщения рибофлавином.</p>
<p>2. Оценка биомеханического эффекта лазериндуцированного</p>	<p>Группа 2.1 (контрольная, <i>ex vivo</i>) – 10 интактных роговиц 10 кроликов;</p>

<p>кросслинкинга в экспериментах по данным тензиометрических испытаний образцов роговиц в экспериментах <i>ex vivo</i> и <i>in vivo</i> (n = 42)</p>	<p>Группа 2.2 (опытная, <i>ex vivo</i>) – 22 глаза кроликов, на которых проведена ФТК без и с предварительным насыщением стромы рибофлавином на глубину 100 мкм: подгруппа 2.2А – 11 глаз 11 кроликов после ФТК с предварительным насыщением рибофлавином; подгруппа 2.2Б – 11 глаз 11 кроликов после ФТК без насыщения рибофлавином.</p> <p>Группа 2.3 (опытная, <i>in vivo</i>) – 10 глаз кроликов, на которых проведена трансФРК без и с предварительным насыщением стромы рибофлавином на глубину 50 мкм: подгруппа 2.3А – 5 глаз 5 кроликов после трансФРК с предварительным насыщением рибофлавином; подгруппа 2.3Б – 5 глаз 5 кроликов после трансФРК без насыщения рибофлавином.</p>
<p>3. Морфологическое исследование стромы роговицы после лазериндуцированного кросслинкинга посредством световой микроскопии в экспериментах <i>in vivo</i> (n = 12)</p>	<p>Группа 3.1 (опытная) – 6 роговиц глаз 6 кроликов после трансФРК с предварительным насыщением рибофлавином;</p> <p>Группа 3.2 (контрольная) – 6 роговиц глаз 6 кроликов после трансФРК без насыщения рибофлавином.</p>
<p>4. Электронно-микроскопическое исследование ультраструктуры стромы роговицы после проведения лазериндуцированного кросслинкинга в экспериментах <i>in vivo</i> (n = 4)</p>	<p>Группа 4.1 (опытная) – 2 роговицы глаз кроликов после трансФРК с предварительным насыщением рибофлавином;</p> <p>Группа 4.2 (контрольная) – 2 роговицы глаз кроликов после трансФРК без насыщения рибофлавином.</p>

Материалы и методы экспериментальных исследований

Общая характеристика экспериментального материала

Эксперименты *ex vivo* и *in vivo* проводились на 90 глазах 90 кроликов породы шиншилла весом 3-4 кг в возрасте 3,5-4 месяцев.

Содержание и наблюдение животных осуществлялось в условиях виварно-экспериментального комплекса НИИ Митоинженерии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова согласно всем санитарно-эпидемиологическим и этическим нормам (центр для проведения экспериментальных исследований на животных SPF статуса – specified pathogen free). Все исследования на животных проводились в соответствии с международными стандартами GLP (Good Laboratory Practice, надлежащая лабораторная практика). Перед проведением экспериментов *ex vivo* и *in vivo* все

животные прошли ветеринарное и офтальмологическое обследование и признаны здоровыми.

Седация и эвтаназия животных проводились посредством внутримышечного введения препарата Золетил 100 (Zoletil 100) (Франция).

Энуклеация аутопсийных глаз осуществлялась при помощи микрохирургического инструментария в условиях операционной Института усовершенствования врачей ФГБУ «НМХЦ им. Н.И. Пирогова».

Транспортировка и хранение глаз совершались при температуре +4⁰С в затемненной герметичной влажной камере, приготовленной на базе изотонического 0,9% раствора NaCl. Срок хранения не превышал 6 часов.

Экспериментальное исследование проведено с соблюдением международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием лабораторных животных. Хирургическое вмешательство осуществлялось стерильным инструментарием в условиях стерильного операционного поля под общей анестезией.

Метод лазериндуцированного кросслинкинга роговицы при эксимерлазерной абляции с рибофлавином

Суть метода лазериндуцированного кросслинкинга заключается в предварительном насыщении в течение 3 минут дезэпителизированной роговицы 0,25% изотоническим раствором рибофлавина перед непосредственным проведением эксимерлазерной абляции.

В работе был предложен следующий алгоритм выполнения фоторефракционной абляции с фотопротекцией и эффектом лазериндуцированного кросслинкинга:

- 1) эпibuльбарная местная анестезия;
- 2) удаление механическим или лазерным способом роговичного эпителия;
- 3) насыщение стромы роговицы 0,25% изотоническим раствором рибофлавина путем нанесения на дезэпителизованную поверхность воздушно-капельной взвеси, полученной с помощью ультразвукового небулайзера в течение 3 минут;

4) проведение дозированной эксимерлазерной абляции.

Для аэрозольного насыщения использовался ультразвуковой небулайзер B.Well WN114 (Великобритания) с мембранно-сетчатой (MESH) технологией диспергирования раствора.

Аэрозольное орошение 0,25% изотоническим раствором рибофлавина в течение 3 минут с помощью ультразвукового небулайзера позволило интенсифицировать насыщение стромы. Это было связано с высокой дисперсностью аэрозольных частиц, что способствовало их более быстрому и глубокому проникновению в строму роговицы, повышению их фармакологической активности. Кроме того, при такой технологии исключалось образование неравномерного слоя раствора рибофлавина на поверхности стромы перед проведением её фоторефракционной абляции.

Дозированная эксимерлазерная абляция роговиц в экспериментах *ex vivo* и *in vivo* без и с предварительным насыщением стромы 0,25% раствором рибофлавина выполнялась на эксимерлазерной офтальмологической установке Wavelight-Allegretto 200 (США) в условиях отделения лазерной микрохирургии глаза ФГБУ «НМХЦ им. Н.И. Пирогова».

Методики клинических наблюдений, используемые в эксперименте *in vivo*

Объектом исследований послужили 32 глаза 32 кроликов:

Группа 1.1 – 16 глаз 16 кроликов после трансФРК на глубину 100 мкм без и с предварительным насыщением стромы раствором рибофлавина:

- подгруппа 1.1А – 8 глаз 8 кроликов после трансФРК с предварительным насыщением рибофлавином;

- подгруппа 1.1Б – 8 глаз 8 кроликов после трансФРК без насыщения рибофлавином.

Группа 1.2 – 16 глаз 16 кроликов после трансФРК на глубину 50 мкм без и с предварительным насыщением стромы раствором рибофлавина:

- подгруппа 1.2А – 8 глаз 8 кроликов после трансФРК с предварительным

насыщением рибофлавином;

- подгруппа 1.2Б – 8 глаз 8 кроликов после трансФРК без насыщения рибофлавином.

Для объективной оценки разницы эпителизации и заживления в раннем послеоперационном периоде контрольные осмотры осуществлялись на 1-е, 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки после эксперимента. Осмотры проводились посредством прямой офтальмоскопии с помощью ручного офтальмоскопа.

Динамика эпителизации, а также состояние эпителия оценивались с применением синего фильтра и раствора флюоресцеина. Клиническая оценка офтальмологического статуса экспериментальных животных проводилась по балльной системе с последующим статистическим анализом результатов.

Для оценки заживления роговицы в раннем послеоперационном периоде использовались следующие критерии:

- слезотечение: 0 – отсутствует; 1 – слабое; 2 – умеренное; 3 – сильное;
- светобоязнь: 0 – отсутствует; 1 – слабая; 2 – умеренная; 3 – сильная;
- отделяемое: 0 – отсутствует; 1 – незначительное; 2 – умеренное; 3 – обильное;
- эрозия эпителия: 0 – отсутствует; 1 – менее 1/3 зоны абляции; 2 – 1/2 зоны абляции; 3 – не менее 3/4 зоны абляции;
- характер эпителизации: 0 – полная; 1 – равномерная по всей окружности зоны абляции; 2 – неравномерная; 3 – очаговая с хаотичным расположением эпителия по зоне абляции, участки гиперплазированного рыхлого эпителия, а также наличие подвижных плохо фиксированных участков эпителия по краю эрозированной зоны;
- состояние эпителия: 0 – эпителий ровный, равномерный по толщине по всей зоне абляции, нет участков прокрашивания эпителия флюоресцеином; 1 – эпителий рыхлый слегка утолщен в срезе, возможно наличие единичных (не более 5) точечных участков прокрашивания эпителия флюоресцеином; 2 – эпителий рыхлый, поверхность его неровная, утолщен в срезе в зоне абляции, точечные бело-серые участки поврежденного эпителия, эпителиальный шов, возможно

наличие множественных различной формы участков прокрашивания эпителия флюоресцеином; 3 – эпителий неравномерный по толщине, явления начальной фиброплазии в виде нежных субэпителиальных помутнений;

- отечность стромы: 0 – отсутствует; 1 – слабая; 2 – умеренная; 3 – выраженная;

- перикорнеальная инъекция: 0 – отсутствует; 1 – слабая; 2 – умеренная; 3 – выраженная;

По итогам осмотра полученные баллы суммировались, проводилось сравнение по принципу «меньше, значит лучше». Максимально возможный балл оценки составлял 27 баллов, минимально возможный – 0 баллов.

Для чистоты эксперимента и исключения влияния сторонних факторов в послеоперационном периоде экспериментальные животные не получали противовоспалительной и антибактериальной терапии.

Методика исследования биомеханических свойств роговиц и проведения ультразвуковых и ОКТ-исследований

Объектом данного исследования послужили 42 глаза 42 кроликов. Из них в экспериментах *ex vivo* проведены тензиометрические испытания на 32 глазах 32 кроликов (группы 2.1 и 2.2); *in vivo* – на 10 глазах 10 кроликов (группа 2.3) соответственно.

Группа 2.1 (контрольная, *ex vivo*) – 10 интактных образцов роговиц 10 кроликов для оценки их нативных упруго-прочностных свойств.

Группа 2.2 (экспериментальная, *ex vivo*) – 22 глаза 22 кроликов, на которых была проведена фототерапевтическая кератэктомия (ФТК) на глубину 100 мкм без и с предварительным насыщением стромы раствором рибофлавина:

- подгруппа 2.2А – 11 глаз 11 кроликов после ФТК с предварительным насыщением стромы рибофлавином;

- подгруппа 2.2Б – 11 глаз 11 кроликов после ФТК без рибофлавина.

Группа 2.3 (экспериментальная, *in vivo*) – 10 глаз 10 кроликов, на которых прижизненно была проведена трансФРК на глубину 50 мкм без и с

предварительным насыщением стромы раствором рибофлавина:

- подгруппа 2.3А – 5 глаз 5 кроликов после трансФРК с предварительным насыщением стромы рибофлавином;

- подгруппа 2.3Б – 5 глаз 5 кроликов после трансФРК без рибофлавина.

Полученные в ходе экспериментов *ex vivo* и *in vivo* из групп экспериментальных животных 2.1, 2.2 и 2.3, были подвержены тензиометрическим испытаниям на установке Zwick/Roell BZ 2.5 /TN1S (Германия). Исследования проводились в лаборатории химии и технологии материалов для сердечно-сосудистой хирургии в ФГБНУ «НЦССХ им. А.Н. Бакулева» (Москва).

Разрывная длина образцов после установки в зажимы составляла 3 мм и включала в себя оптическую зону роговицы. Размер разрывной длины также обусловлен и площадью зоны абляции в ходе эксперимента (5,5 мм), дабы исключить влияние биомеханических свойств неизмененных участков роговицы на результаты тензиометрических испытаний.

Регистрация и графическое отображение тензиометрических данных выполнялись в программе TextExpert, установленной на сопряженном с разрывной машиной персональном компьютере.

В ходе экспериментов *ex vivo* на всех глазах выполнена ультразвуковая кератопахиметрия, которая осуществлялась на установке Nidek UP-1000 (Япония). В экспериментах *in vivo* каждому животному была выполнена оптическая когерентная томография роговицы на томографе OPTOVUE RTVue-100 (США).

Методика морфологического исследования роговиц экспериментальных животных после процедуры фоторефракционной абляции с фотопротекцией и эффектом кросслинкинга

Морфологические исследования выполнены на базе виварно-экспериментального комплекса НИИ Митоинженерии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Объектом исследования служили препараты роговиц 12 глаз 12 кроликов, прижизненно подвергнутые эксимерлазерной абляции на глубину 50 мкм без (6 глаз) и с (6 глаз) предварительным насыщением стромы изотоническим 0,25% раствором рибофлавина – группы 3.1 и 3.2 соответственно.

Гистотехническая обработка включала фиксацию роговиц жидкостью Карнуа в течение 3 часов, отмывку в этиловом спирте, проводку через изопропиловый спирт и заливку правильно ориентированных образцов в парафиновую среду.

Нарезка образцов производилась вдоль назо-tempоральной оси, из центральной области роговицы получали 8 поперечных срезов толщиной 3 мкм, каждый следующий срез брали, отступая 100 мкм от предыдущего. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а в отдельных случаях согласно методам Ван Гизона и Массона, и анализировали под световым микроскопом AxioScope A.1. Микрофотографирование выполняли камерой высокого разрешения AxioCam MRc5 с помощью программного обеспечения AxioVision (Carl Zeiss, Германия). Контроль правильности плоскости резки проводили, оценивая ориентацию десцеметовой мембраны.

Методика проведения трансмиссионной электронной микроскопии

Исследования ультраструктуры стромы роговицы посредством трансмиссионной электронной микроскопии после проведения лазериндуцированного кросслинкинга осуществлялись на базе Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, а также в Центре фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова.

Объектом исследования служили препараты роговиц 4 глаз 4 кроликов, прижизненно подвергнутые эксимерлазерной абляции на глубину 50 мкм без (2 глаза) и с (2 глаза) предварительным насыщением стромы изотоническим 0,25% раствором рибофлавина – группы 4.1 и 4.2 соответственно.

Контрастирование срезов (по Рейнольдсу) – 1% водным раствором уранила ацетата.

Визуализация: электронный микроскоп JEM-1400, Jeol (Япония) при ускоряющем напряжении 80 киловольт. Увеличение от x2500 до x25000.

Методика статистической обработки результатов исследования

Статистическая обработка полученных в ходе эксперимента данных осуществлялась на персональном компьютере с предустановленным программным обеспечением Statistica 8 и Statistica 10. Для оценки полученных данных использовали методы параметрической описательной статистики с определением средней арифметической величины (M) и стандартного отклонения ($\pm\sigma$). Статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием t-критерия Стьюдента: в случаях сопоставления разных исследуемых групп – для независимых выборок; в случае оценки динамики исследуемых показателей в одной группе или оценки различий – для зависимых выборок. Различия сравниваемых показателей принимались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование влияния лазериндуцированного кросслинкинга на функциональное состояние роговицы и особенности клинического течения в послеоперационном периоде в экспериментах *in vivo*

На протяжении всего периода наблюдений в обеих группах выявлена клиническая разница в выраженности воспалительных и регенераторных процессов. У животных группы 1.2 в случае абляции с рибофлавином полная эпителизация наступала раньше (чаще к 3-м суткам, против 7-х суток, в случае абляции без предварительного насыщения рибофлавином), слезотечение и светобоязнь практически полностью исчезали к концу 3-х суток.

Стоит отметить, что в группе 1.1 на всех этапах контрольных осмотров клинический статус животных не был удовлетворительным. Уже на ранних

сроках послеоперационного периода полученные клинические данные позволили судить о проведённом избыточном объеме абляции (для данного вида животных), что привело к возникновению ответной асептической воспалительно-регенераторной реакции, выраженной в появлении множественных «хейзов», неполной эпителизации, устойчивом помутнении стромы роговицы, а также сохранявшегося дефекта эпителия в центральной оптической зоне роговицы. Однако именно в этой экспериментальной группе разница между глазами, аблированными без и с предварительным насыщением рибофлавином, была наиболее выраженной.

Достоверная разница среднебалльных значений определялась уже с 3-х суток и сохранялась до конца периода наблюдений. Так, к 3-м суткам средний балл клинического состояния у животных после трансФРК с рибофлавином составлял $6,7 \pm 1,4$, тогда как у животных после абляции без рибофлавина он был равен $9,8 \pm 4,6$ ($p < 0,05$). К концу 7-х суток средний балл составлял $4,3 \pm 3,9$ и $7,5 \pm 2,6$ соответственно. На 14-е сутки средний балл у животных после фотоабляции с рибофлавином был равен $3,2 \pm 1,9$, в то время как у животных после трансФРК без рибофлавина – $6,3 \pm 2,6$. К концу периода наблюдений (21-е сутки) средний балл у животных после трансФРК с рибофлавином составлял $3,8 \pm 1,0$, против $6,3 \pm 3,0$ у животных после абляции без рибофлавина (рисунок 1).

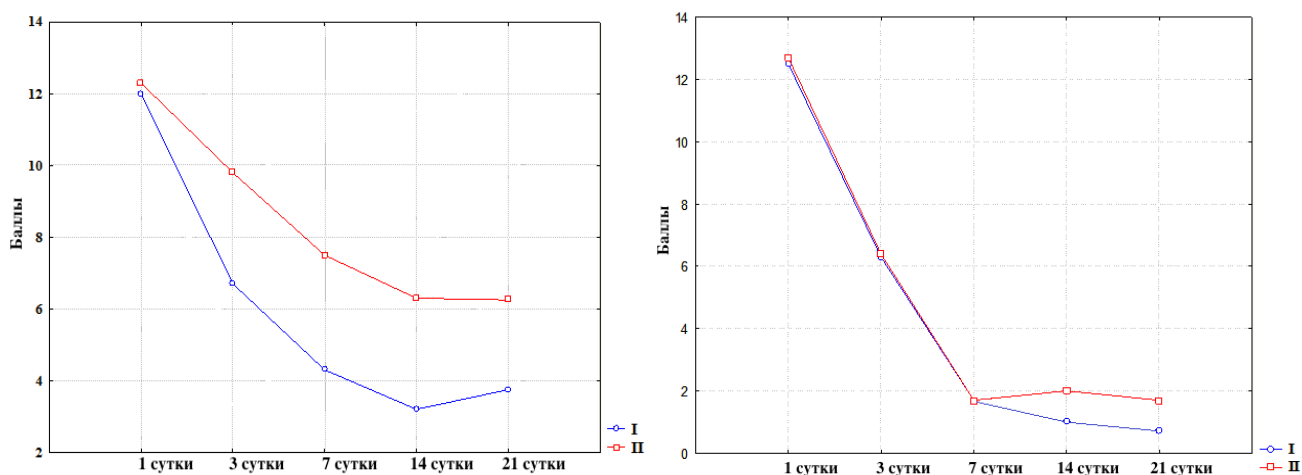


Рисунок 1 – Кривые распределения средних величин (M), полученных в ходе балльной оценки клинического состояния глаз кроликов (по 27-балльной шкале) после трансэпителиальной ФРК с глубиной абляции по центру на 100 мкм (слева) и 50 мкм (справа) с предварительным насыщением стромы роговицы раствором рибофлавина (I) и без него (II)

Таким образом, на протяжении всего периода наблюдений в группах 1.1. и 1.2 диагностирована разница в выраженности воспалительных и регенераторных процессов. Так, на глазах после фоторефракционной кератоабляции с рибофлавином все вышеперечисленные реакции проходили заметно менее выражено, о чем свидетельствуют среднебальные оценки всех экспериментальных животных из обеих групп, что, в свою очередь, не может не свидетельствовать о фотопротекторных свойствах рибофлавина.

Оценка биомеханических свойств роговицы и влияния фотосенсибилизатора на скорость и глубину абляции после фоторефракционной кератэктомии без и с предварительным насыщением стромы роговицы раствором рибофлавина в экспериментах *ex vivo* и *in vivo*

При оценке биомеханических свойств аблированных образцов роговиц кроликов, предварительно насыщенных рибофлавином, было отмечено повышение их упруго-прочностных свойств по сравнению с аналогичными образцами, на которых абляция проводилась без насыщения рибофлавином. Такие заключения были сделаны по результатам анализа таких свойств, как прочность при растяжении, сила на разрыв и модуль упругости (таблица 2).

Таблица 2 – Биомеханические свойства образцов роговиц после дозированной ФТК абляции на глубину 100 мкм в экспериментах *ex vivo* и трансФРК с глубиной абляции по центру 50 мкм в экспериментах *in vivo* без и с предварительным насыщением стромы рибофлавином ($M \pm \sigma$)

Биомеханический параметр	Прочность при растяжении (мПа)		Максимальная сила при разрыве (Н)		Модуль упругости (Модуль Юнга) (Н/мм ²)	
Группы						
2.1: интактные образцы роговиц (n=10)	5,1±0,6		19,2±2,1		0,9±0,5	
2.2А: с насыщением рибофлавином, 100 мкм (ФТК, n=11)	7,2±1,6	p = 0,0011	12,0±2,8	p = 0,005	0,9±0,4	p = 0,016
2.2Б: без насыщения рибофлавином, 100 мкм (ФТК, n=11)	5,1±1,4		8,7±2,5		0,5±0,2	

2.3А: с насыщением рибофлавином, 50 мкм (трансФРК, n=5)	12,8± 1,3	p = 0,0004	18,3±1,2	p = 0,0004	1,0±0,3	p = 0,7
2.3Б: без насыщения рибофлавином, 50 мкм (трансФРК, n=5)	8,8±0,9		12,8±1,6		0,9±0,2	

Так, на примере эксперимента *ex vivo*, было выявлено статистически значимое увеличение прочности при растяжении – $12,8 \pm 1,3$ мПа у образцов, аблированных на глубину 100 мкм с предварительным насыщением стромы раствором рибофлавина, против $8,8 \pm 0,9$ мПа у образцов, аблированных на глубину 100 мкм без предварительного насыщения стромы раствором рибофлавина ($p=0,0011$). При оценке результатов эксперимента *iv vivo* данная тенденция подтвердилась: $12,8 \pm 1,3$ мПа у образцов, аблированных с предварительным насыщением раствором рибофлавина, против $8,8 \pm 0,9$ мПа у образцов, аблированных без предварительного насыщения ($p=0,0004$). При этом показатель прочности при растяжении у образцов из контрольной группы составил $5,1 \pm 0,6$ мПа.

При анализе максимальной силы при разрыве также выявлено статистически значимое увеличение – $12,0 \pm 2,8$ Н у образцов, аблированных на глубину 100 мкм с предварительным насыщением стромы раствором рибофлавина, против $8,7 \pm 2,5$ Н у образцов, аблированных на глубину 100 мкм без предварительного насыщения стромы раствором рибофлавина ($p=0,005$). При оценке результатов эксперимента *iv vivo*: $18,3 \pm 1,2$ Н у образцов, аблированных с предварительным насыщением раствором рибофлавина, против $12,8 \pm 1,6$ Н у образцов, аблированных без предварительного насыщения ($p=0,0004$). При этом показатель максимальной силы при разрыве у образцов из контрольной группы составил $19,2 \pm 2,1$ Н.

Стоит отметить обнаруженную достоверную разницу между показателями модуля упругости (модуль Юнга) в случае абляции без и с предварительным насыщением стромы роговицы раствором рибофлавина в экспериментах *ex vivo*, и ее отсутствие в экспериментах *in vivo*.

Как известно, модуль упругости (модуль Юнга) является основным критерием определения тензиометрических характеристик роговицы при стандартной технологии кросслинкинга. Увеличение значения модуля упругости (модуль Юнга) может достигать 200-300%, включая при этом все негативные аспекты процедуры в целом. Целью наших экспериментов было достижение исходных, либо слегка превосходящих исходные, упруго-прочностных свойств, сохранив при этом упругость («жесткость») роговицы на исходном, либо близко к исходному, уровне. Такой подход позволяет избавить роговицу от нежелательной УФ-нагрузки, сохранить упруго-эластические свойства, а также минимизировать тот ущерб, который обычно наносится роговице на клеточном и функциональном уровнях во время процедуры «классического» кросслинкинга. Таким образом, наличие достоверного увеличения максимальной силы при разрыве и прочности при растяжении, а также отсутствие достоверной разницы в показателях модуля упругости (модуль Юнга) в экспериментах *in vivo* указывает на физиологичность предложенной технологии лазериндуцированного кросслинкинга.

Проведенные кератопахиметрические исследования, а также данные оптической когерентной томографии роговицы показали, что использование рибофлавина на физиологическом растворе не оказывает влияния на скорость и точность абляции. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Влияние насыщения роговицы рибофлавином на точность фотоабляции в экспериментах *ex vivo* и *in vivo* по данным кератопахиметрии и оптической когерентной томографии (n=42, p>0,5)

Показатели	Толщина роговицы до абляции (мкм)	Толщина роговицы после абляции на глубину 100 мкм	
		без предварительного насыщения раствором рибофлавина (мкм)	с предварительным насыщением стромы раствором рибофлавина (мкм)
В экспериментах <i>ex vivo</i>	472 ±24	382 ±28	373 ±29
В экспериментах <i>in vivo</i>	452 ±24	346 ±27	339 ±28

Морфологические исследования роговиц экспериментальных животных (кроликов) после эсимерлазерной абляции без и с предварительным насыщением стромы раствором рибофлавина в экспериментах *in vivo*

Сравнение полученных результатов привело к следующему заключению: абляция в обоих случаях проведена эффективно и на одинаковую глубину. На 1-е сутки в центральной области роговиц отсутствуют эпителий и поверхностная часть стромы, воспалительная инфильтрация сильнее выражена в тех случаях, где абляция проводилась с предварительным насыщением стромы роговицы раствором рибофлавина. Однако признаки воспаления при этом дольше персистируют на глазах после абляции без рибофлавина – есть отдельные псевдоэозинофильные гранулоциты. В обоих вариантах наблюдается незначительное утолщение роговицы за счет отека наружных слоев стромы роговицы, который спадает к 3-му дню.

Эпителизация роговицы эффективнее и активнее происходит на глазах после абляции с рибофлавином. На 7-е сутки она полная, тогда как на глазах после абляции без рибофлавина в центре роговицы отмечается небольшой неэпителизированный участок. Новообразованный эпителий во всех случаях построен правильно; отличается только количество его слоев и форма клеток (следствие процесса эпителизации и гистологической аккомодации эпителия).

Во всех образцах происходит активация кератоцитов и изменения в неклеточной части стромы в проекции абляции, при этом качество коллагеновых волокон разное: в случаях после абляции без рибофлавина волокна более регулярные и на 3-и и на 7-е сутки, тогда как на глазах после абляции с рибофлавином отмечаются короткие разнонаправленные волокна; строма близ зоны абляции построена нерегулярно, что может быть морфологическим отражением процесса кросслинкинга коллагена под воздействием вторичного УФ-лазерного излучения.

В остальных слоях роговицы принципиальных отличий от нормы не наблюдается. Не выявлено ярко выраженного снижения плотности кератоцитов в исследованных роговицах, напротив, в области повреждения среди измененных волокон коллагена субъективно повышена клеточность стромы.

Электронно-микроскопическое исследование ультраструктуры стромы роговицы после проведения лазериндуцированного кросслинкинга в экспериментах *in vivo*

Анализ ультраструктурных изменений 4 образцов роговиц (группы 4.1 и 4.2), по данным трансмиссионной электронной микроскопии, также показал, что после проведения трансэпителиальной ФРК с предварительным насыщением стромы изотоническим раствором рибофлавина наблюдаются свойственные кросслинkinгу изменения, : укрупнение волокон и пучков коллагена; образование новообразованных пучков коллагена; увеличение компактности упаковки волокон за счет количества поперечных сшивок (рисунок 2). По результатам комплексной морфологической оценки посредством световой и трансмиссионной электронной микроскопии, установлено, что роговица в ходе фоторефракционной кератоабляции с предварительным насыщением стромы раствором рибофлавина подвержена изменениям, соответствующим кросслинkinгу.

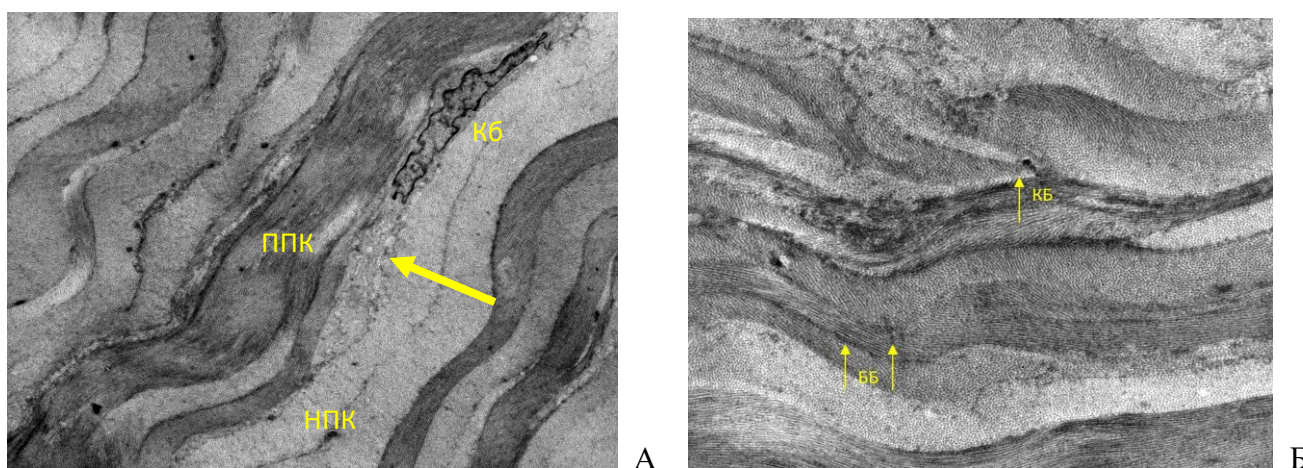


Рисунок 2 – Трансмиссионная электронная микроскопия роговицы кроликов опытной группы 4.1 с насыщением стромы рибофлавином. Продольный срез пучков коллагена: А, Б – варианты слияния пучков: ППК – предшествующий пучок коллагена; НПК – новообразованный пучок коллагена; КБ – кератобласт; ББ – «бок в бок»; КБ – «конец в бок». Увеличение $\times 4000$

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования показали, что вторичное излучение, индуцируемое в ходе абляции, может быть использовано для эффекта кросслинkinга коллагена стромы роговицы, при ее насыщении 0,25% изотоническим раствором рибофлавина, а лазериндуцированный кросслинkinг может рассматриваться как альтернативный щадящий вариант технологии кросслинkinга роговицы в фоторефракционной

хирургии. Предварительное насыщение стромы роговицы раствором рибофлавина также оказывает фотопротекторный эффект, что благоприятно сказывается на скорости эпителизации и снижает ответную воспалительно-регенераторную реакцию в послеоперационном периоде.

ВЫВОДЫ

1. Методика фоторефракционной кератэктомии с фотопротекцией и эффектом кросслинкинга предусматривает предварительное аэрозольное насыщение стромы роговицы 0,25% изотоническим раствором рибофлавина. При такой технологии абляции рибофлавин в строме роговицы поглощает индуцированное абляционное вторичное излучение, которое инициирует затухающий эффект кросслинкинга в слоях стромы, прилежащих к зоне рефракционного вмешательства, и не влияет на точность абляции.

2. Фотопротекторный эффект эксимерлазерной кератоабляции с рибофлавином ускоряет эпителизацию и уменьшает ответную воспалительно-регенераторную реакцию.

3. Биомеханический эффект лазериндуцированного кросслинкинга роговицы при её абляции с рибофлавином сопровождается достоверным увеличением прочности при растяжении (с $5,1 \pm 1,4$ до $7,2 \pm 1,6$ мПа, $p=0,001$) и максимальной силы на разрыв (с $8,7 \pm 2,5$ до $12,0 \pm 2,8$ Н, $p=0,005$).

4. По данным световой микроскопии, фоторефракционная кератоабляция с рибофлавином не нарушает плотности кератоцитов, строма близ зоны абляции построена нерегулярно, отмечаются короткие разнонаправленные волокна, что может быть морфологическим отражением процесса кросслинкинга коллагена под воздействием вторичного ультрафиолетового лазерного излучения.

5. Результаты трансмиссионной электронной микроскопии показали наличие изменений ультраструктур стромы роговицы после проведения эксимерлазерной абляции с предварительным насыщением рибофлавином, соответствующие эффекту кросслинкинга, с формированием стабильных поперечных сшивок коллагеновых волокон.

Практические рекомендации

1. Методика эксимерлазерной абляции с предварительным насыщением стромы 0,25% изотоническим раствором рибофлавина может быть применена при различных технологиях фоторефракционных операций на роговице.

2. Фоторефракционная абляция с рибофлавином может быть рекомендована для профилактики кератэктазий, особенно в случаях коррекции аметропий высоких степеней и при исходно тонкой роговой оболочке.

3. Лазериндуцированный кросслинкинг при эксимерлазерной абляции с рибофлавином позволяет компенсировать ослабление биомеханических свойств роговицы вследствие её истончения при фоторефракционной кератэктомии.

Список публикаций по теме диссертации:

1. Корниловский И.М., Султанова А.И., Миришова М.Ф., **Бурцев А.А.** Эффекты фотопротекции и кросслинкинга при новой технологии фоторефракционной абляции // Современные технологии в офтальмологии. – 2014. – № 3. – С. 161.

2. Корниловский И.М., **Бурцев А.А.** О целесообразности проведения кросслинкинга роговицы в фоторефракционной хирургии // Восток-Запад: Междунар. научно-практ. конф. по офтальмохирургии, 5-я: Сб. научн. тр. – Уфа, 2014. – С. 52-54.

3. Корниловский И.М., **Бурцев А.А.**, Султанова А.И. Экспериментальная оценка фотопротекции рибофлавином при эксимер-лазерной рефракционной абляции роговицы // Катарактальная и рефракционная хирургия. – 2015. – Т. 15, № 4. – С. 35-39.

4. Корниловский И.М., **Бурцев А.А.** Теоретическое и экспериментальное обоснование лазериндуцированного кросслинкинга в фоторефракционной хирургии роговицы // Катарактальная и рефракционная хирургия. – 2015. – Т.15, № 1. – С. 20-25.

5. Корниловский И.М., Султанова А.И., **Бурцев А.А.**, Миришова М.Ф., Сафарова А.Н. Трансэпителиальная ФРК с фотопротекцией и эффектом

кросслинкинга // Катарактальная и рефракционная хирургия. – 2015. – Т. 15, № 3. – С. 27-33.

6. Корниловский И.М., **Бурцев А.А.**, Султанова А.И. Экспериментально-клиническое обоснование новой технологии рефракционной эксимерной лазерной абляции с эффектом кросслинкинга // Современные технологии в офтальмологии. – 2015. – № 4. – С. 149.

7. Kornilovskiy I.M., Kasimov E.M., Sultanova A.I., **Burtsev A.A.** Laser-induced corneal cross-linking upon photorefractive ablation with riboflavin // Clinical Ophthalmology. – 2016. – Vol. 3. – P. 587-593.

8. Корниловский И.М., Султанова А.И., **Бурцев А.А.** Фотопротекция рибофлавином с эффектом кросслинкинга при фоторефракционной абляции роговицы // Вестн. офтальмологии. – 2016. – № 3. – С. 37-41.

9. Kornilovskiy I.M., Kasimov E.M., Sultanova A.I., **Burtsev A.A.**, Mirishova M.F. Experimental evaluation of a photoprotection by riboflavin in the excimer laser refractive keratectomy. Research // Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2016. – Vol. 7. – No. 6. – P. 188-194.

10. **Бурцев А.А.**, Корниловский И.М., Голяков А.А. Применение кросслинкинга роговицы в лазерной рефракционной хирургии (научный обзор) // Катарактальная и рефракционная хирургия. – 2017. – Т. 17, № 3. – С. 4-8.

11. Корниловский И.М., Шишкин М.М., Голяков А.А., **Бурцев А.А.**, Гиля А.П. ОКТ роговицы в оптимизации новой технологии трансэпителиальной ФРК с рибофлавином // Точка зрения. Восток–Запад. – 2018. – № 1. – С. 52-54.

12. Борзенко С.А., Корниловский И.М., **Бурцев А.А.**, Шацких А.В. Оценка эффекта кросслинкинга при фоторефракционной кератоабляции с рибофлавином по данным трансмиссионной электронной микроскопии // Патогенез. – 2019. – Т. 17, № 2.

Патенты по теме диссертации

1. Корниловский И.М., Бурцев А.А., Султанова А.И., Миришова М.Ф., Сафарова А.Н. Способ фоторефракционной абляции роговицы. Патент РФ на изобретение № 2578388 с приоритетом от 21.10.2014.