

ИНСТИТУТ УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ВРАЧЕЙ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИКО-ХИРУРГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
ИМЕНИ Н.И.ПИРОГОВА» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Бурцев Александр Александрович

**ФОТОРЕФРАКЦИОННАЯ КЕРАТОАБЛЯЦИЯ
С ФОТОПРОТЕКЦИЕЙ И ЭФФЕКТОМ КРОССЛИНКИНГА**

(экспериментальное обоснование)

14.01.07 – глазные болезни

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Корниловский Игорь Михайлович

Научный консультант:

доктор медицинских наук

Борзенко Сергей Анатольевич

Москва 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА I. ЛАЗЕРИНДУЦИРОВАННОЕ РЕФРАКЦИОННОЕ КЕРАТОМОДЕЛИРОВАНИЯ И КРОССЛИНКИНГ В ФОТОРЕФРАКЦИОННОЙ ХИРУРГИИ (обзор литературы).....	10
1.1 Основные понятия об упруго-прочностных свойствах и их влияние на биомеханику роговицы.....	10
1.2 Современные технологии кросслинкинга роговицы с фотосенсибилизатором рибофлавином и их применение в фоторефракционной хирургии.....	13
1.3 Преимущества применения УФ лазерного излучения при полимеризации различных материалов без и с фотосенсибилизаторами для усиления эффекта кросслинкинга.....	21
1.4 Обоснование целесообразности кератоабляции с рибофлавином для фотопротекции в фоторефракционной хирургии.....	26
1.5 Переход от лазериндуцированного рефракционного кератомоделирования и кросслинкинга к лазериндуцированному кросслинкингу при кератоабляции с рибофлавином в фоторефракционной хирургии.....	29
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	39
2.1. Общая характеристика экспериментального материала.....	39
2.2. Методики экспериментальных исследований.....	41
2.2.1. Методика лазериндуцированного кросслинкинга роговицы при эксимерлазерной абляции с рибофлавином в экспериментах <i>ex vivo</i> и <i>in vivo</i> и дизайн исследований..	41
2.2.2. Методика биомеханического тестирования образцов роговиц.....	43
2.2.3. Методика световой микроскопии.....	46
2.2.4. Методика проведения трансмиссионной электронной микроскопии.....	49
2.2.5. Методика проведения ультразвуковых и ОКТ-исследований в эксперименте.....	50
2.2.6. Методики клинических наблюдений, используемые в эксперименте <i>in vivo</i>	52
2.3. Методы статистической обработки экспериментального материала.....	53

ГЛАВА III. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЛАЗЕРИНДУЦИРОВАННОГО КРОССЛИНКИНГА ПОСЛЕ ЭКСИМЕРЛАЗЕРНОЙ АБЛЯЦИИ РОГОВИЦЫ С РИБОФЛАВИНОМ.....	54
3.1 Особенности клиники лазериндуцированного кросслинкинга при эксимерлазерной абляции роговицы с рибофлавином в экспериментах <i>in vivo</i>	54
3.2 Оценка биомеханических свойств роговицы после лазериндуцированного кросслинкинга при эксимерлазерной абляции роговицы без и с предварительным насыщением стромы роговицы раствором рибофлавина в экспериментах <i>ex vivo</i>	62
ГЛАВА IV. КОМПЛЕКСНАЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА РЕФРАКЦИОННОЙ КЕРАТОАБЛЯЦИИ С ФОТОПРОТЕКЦИЕЙ И ЭФФЕКТОМ КРОССЛИНКИНГА.....	67
4.1. Морфологические изменения после лазериндуцированного кросслинкинга при эксимерлазерной абляции роговицы без и с рибофлавином в экспериментах <i>in vivo</i> по данным световой микроскопии.....	67
4.2. Результаты электронно-микроскопического исследования ультраструктуры стромы роговиц после проведения эксимерлазерной абляции без и с предварительным насыщением рибофлавином.....	75
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	81
ВЫВОДЫ.....	92
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОММЕНДАЦИИ.....	93
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	94

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

История лазерной рефракционной хирургии насчитывает более 35 лет. В настоящее время основным выбором среди эксимерлазерных вмешательств является операция LASIK (лазерный in situ кератомилез), что обуславливается быстрым восстановлением зрительных функций и безболезненным периодом реабилитации за максимально короткие сроки послеоперационного периода. Однако очевидно, что формирование роговичного лоскута не только приводит к нарушению анатомической целостности роговицы и ее иннервации, но и индуцирует комплекс изменений, влияющих на ее биомеханические свойства. Другой метод – фоторефракционная кератэктомия (ФРК) – пользуется меньшей популярностью среди рефракционных хирургов и пациентов из-за более длительного и болезненного послеоперационного периода, хотя является альтернативным при определенных анатомических особенностях роговицы. На сегодняшний день многие офтальмохирурги по всему миру пересмотрели свое отношение к этому методу кераторефракционной хирургии и считают «безножевую» технику ФРК более щадящей, по сравнению с методом LASIK, в части сохранения биомеханических функций и восстановления структурных изменений роговицы (Dan Z., 2013; Reinstein D.Z., 2013).

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод, что большинство фоторефракционных операций на роговице сопровождаются ослаблением ее биомеханических свойств, что в ряде случаев может привести к возникновению индуцированной ятрогенной кератэктазии (Анисимов С.И., 2011-2016; Бикбов М.М., 2011-2015; Корниловский И.М., 2009-2016; Нероев В.В. соавт., 2009-2016; Hafezi F., Kanellopoulos J., 2007-2015). На сегодняшний день известна проблема возникновения кератэктазий у пациентов после проведения фоторефракционных операций. С таким осложнением в первую очередь столкнулись рефракционные хирурги при

выполнении операции эксимерлазерного *in situ* кератомилеза, так как при данном типе операции еще на стадии формирования роговичного лоскута возникает ослабление прочностных характеристик роговицы на 20-35%, и это ослабление только усиливается с увеличением объема абляции (Celik H.U., Alagöz N., 2012; Reinstein D.Z., Archer T.J., 2013; Schmack I., Dawson D.G., 2005).

Идею о возможности биомеханического и биохимического укрепления тканей роговицы высказал профессор T. Seiler еще в 1990 году. Суть метода заключена в эффекте фотополимеризации стромальных волокон под воздействием фоточувствительной субстанции (раствор рибофлавина) и ультрафиолетового воздействия (Seiler T., Spoerl E., Wollensak G., 1992).

Однако, несмотря на прогресс в данном направлении, комбинирование кросслинкинга роговицы с фоторефракционными операциями на ней до настоящего времени не получило широкого распространения в клинической практике. Это связано с целым рядом нежелательных побочных эффектов, обусловленных ультрафиолетовым облучением роговицы при кросслинкинге (Измайлова С.Б. с соавт. 2012-2014; Корниловский И.М., 2014-2016; Малюгин Б.Э. с соавт., 2014-2016; Touboul D., Efron N., 2012-2014; Wollensak G., Spoerl E., 2004-2015). 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.

Поиск эффективного и одновременно безопасного метода коррекции аметропии с сохранением биомеханических параметров роговицы

подчеркивает актуальность изучаемой проблемы и обосновывает дальнейшие исследования влияния эксимерлазерных операций на упруго-прочностные свойства и структуру роговицы.

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, предусматривающее 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 глублежащих 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.

Работа выполнена на кафедре глазных болезней Института усовершенствования врачей на базе ФГБУ «Национальный медико-хирургический Центр им. Н.И. Пирогова» при Министерстве Здравоохранения Российской Федерации.

ГЛАВА I. ЛАЗЕРИНДУЦИРОВАННОЕ РЕФРАКЦИОННОЕ КЕРАТОМОДЕЛИРОВАНИЕ И КРОССЛИНКИНГ В ФОТОРЕФРАКЦИОННОЙ ХИРУРГИИ (обзор литературы)

1.1. Основные понятия об упруго-прочностных свойствах и их влияние на биомеханику роговицы

Роговица и склера образуют единую опорную корнеосклеральную оболочку глаза, представляя собой два сопряженных сегмента с различным радиусом кривизны и отличными друг от друга биомеханическими свойствами [1, 3, 4, 6, 19]. Прозрачность и высокая преломляющая сила роговицы обеспечиваются благодаря ее регулярному строению. Основная часть роговицы – строма, сформирована параллельно расположенными коллагеновыми фибриллами, которые, в свою очередь, уложены в переплетающиеся пластины [138, 155, 169, 170, 237]. Напряженно-деформированное состояние ткани роговицы определяется, прежде всего, прочностными свойствами самих волокнистых структур, их архитектоникой, внутри- и межмолекулярными связями фибриллярных и других межучасточных структур. Кроме того, важную роль в формировании биомеханического статуса роговицы играет ее общая архитектура (геометрическая форма, диаметр, толщина, радиусы кривизны).

При построении биомеханических моделей, описывающих роговицу и включающих область ее сопряжения со склерой, важно учитывать достаточно большое число параметров, которые зачастую сложно оценить из-за гетерогенности, анизотропности и асимметричности роговицы. Требуется также учитывать воздействие на оболочки глаза внутриглазного давления (ВГД) и экстраокулярных мышц. Распределение механических напряжений в роговице во многом определяется свойствами других структур стенок глазного яблока, в том числе лимба и склеры. Склера, вследствие

хаотического расположения фибрилл и волокон отличается по своим механическим свойствам от роговичной ткани.

Изучение патогенеза ятрогенных эктазий, периферических дистрофий, кератоконуса и прогрессирующей миопии, в развитии которых большую роль играет повышенная растяжимость роговицы и склеры, требует углубления знаний о биомеханическом взаимодействии этих глазных структур [2, 13, 15, 23, 24, 26-28, 31, 32, 73, 76, 97]. Экспериментальные исследования свидетельствуют, что материал роговицы отличается биомеханической неоднородностью. Целый ряд работ посвящен прямому измерению основных упруго-прочностных свойств роговичной ткани в норме и даже при некоторых патологических состояниях [1, 3, 19, 55, 56, 136, 144, 217, 222]. Следует отметить, что даже прямое измерение механических параметров изолированной роговицы дает большой разброс показателей, обусловленный как отсутствием стандартных условий для таких исследований, так и нелинейными биомеханическими свойствами материала роговицы.

Как показывают данные экспериментальных работ, значения модуля упругости существенно меняются в зависимости от диапазона нагрузок, приложенных к образцу роговицы, и могут различаться на 1-2 порядка. В работах представлено, что в пределах нагрузок от 2 до 4 кПа (что соответствует диапазону ВГД 15-30 мм рт.ст.) модуль упругости постоянен, но его величина резко возрастает при более высоком ВГД. При нагрузке, в 100 раз превышающей физиологическую, величина модуля упругости роговицы E составляет 57 мПа, в то время как при нагрузке, соответствующей нижней границе нормального ВГД (10 мм рт.ст.), модуль упругости существенно ниже – 0,34-0,54 мПа [19, 269]. При давлении, находящемся в диапазоне от 25 мм рт.ст. (верхняя граница нормального ВГД) до 200-300 мм рт.ст., значения модуля упругости роговицы достигают $13,6 \pm 5,0$ мПа. Результаты исследований свидетельствуют о неоднородности

роговичной ткани, поскольку при меридиональном напряжении модуль Юнга оказался выше в центре, а при радиальном напряжении – на периферии.

Предел прочности целой роговицы, определяющийся в основном механическими свойствами ее стромы (вклад боуменовой мембраны и других структур роговицы практически не существенен), составляет $19,1 \pm 3,5$ мПа, при этом передняя часть стромы на 25% прочнее, чем задняя [50, 222, 259]. В некоторых работах указывается на изменение механических характеристик роговицы при глазных заболеваниях. Так, обнаружено, что при кератоконусе модуль Юнга в центральной зоне роговицы снижается. Кроме того, изучение механических свойств роговицы изолированных глаз с использованием оригинальной методики, позволяющей проводить механические испытания роговично-склеральных колец, вырезанных из роговицы трупных глаз, показало, что в результате эксимерлазерной фотоабляции толщина оптической зоны роговицы снижается на 15-20%, что приводит к критическим изменениям механических свойств роговицы, в частности, к существенному снижению ее прочности [51, 52, 137, 154, 155].

Необходимо подчеркнуть, что результаты механических испытаний образцов изолированной роговицы не могут полностью соответствовать реальным характеристикам в естественных условиях. Безусловно, наиболее информативные сведения о биомеханическом статусе роговицы могут дать только прижизненные исследования. В качестве возможных подходов к опосредованному определению данных параметров использовали оптическую и голографическую интерферометрию, механическую спектроскопию, акустическую биометрию и метод фотоупругости. Возможно, наиболее перспективным для последующего использования в клинике является метод фотоупругости, с помощью которого было показано, что фотоупругие свойства роговицы характерно изменяются при различных офтальмопатологиях, причем перераспределение напряжений в роговице может рассматриваться как интегральный показатель изменений в биомеханической системе глаза в целом [102].

1.2. Современные технологии кросслинкинга роговицы с фотосенсибилизатором рибофлавином и их применение в фоторефракционной хирургии

Биомеханические свойства роговицы зависят от состояния коллагеновых волокон, межколлагеновых связей и их структурной организации [1, 3, 55, 56]. Отличия упруго-прочностных свойств у здоровых и больных людей подтверждены серией экспериментальных работ [7, 13, 83, 202], что послужило своеобразным толчком для изучения этого феномена. Было обнаружено, что под влиянием различных внешних факторов (ферменты, озон, ультрафиолетовое излучение и т.п.) происходит эффект склеивания фибрилл коллагена – кросслинкинг. Данный эффект является результатом окислительного процесса [48, 71, 131, 172, 203].

Первые исследования были начаты еще в 1990 году с целью оценить возможность «склеивания» роговичного коллагена под действием ряда различных факторов [69, 264], что могло бы привести к повышению механических свойств роговицы. На тот момент было известно, что похожие изменения в стромальном коллагене происходят при старении роговицы, которые сопровождаются уплотнением и утолщением стромальных коллагеновых волокон примерно на 4,5%. Подобные изменения также происходят при сахарном диабете [219, 249]. Феномен утолщения и уплотнения стромальных волокон может быть продемонстрирован с помощью сканирующей электронной микроскопии [132, 207, 242, 254].

В результате серии экспериментальных работ была разработана методика роговичного коллагенового кросслинкинга, основанная на эффекте фотополимеризации стромальных волокон при участии фотосенсибилизирующего вещества – рибофлавина и низких доз ультрафиолетового (УФ) излучения [74, 119, 133, 173, 174, 244, 247, 248, 260, 262]. Экспериментально было доказано, что в присутствии рибофлавина степень абсорбции ультрафиолета роговицей повышается с 32 до 90%, а повреждение

коллагеновых волокон ультрафиолетовым излучением сводится к минимуму [220, 221, 223].

Разработка данной методики была вызвана стремлением приостановить прогрессирование кератоконуса в рефракционной фазе за счет «склеивания» фибрилл и повышения упруго-прочностных свойств роговицы [12, 14, 25, 65, 78, 79, 124, 218].

Метод роговичного коллагенового кросслинкинга представляет собой фотополимеризацию стромальных волокон, возникающую в результате комбинированного воздействия фотосенсибилизатора (рибофлавина) и ультрафиолетового света.

Методика была предложена в 1999 году группой ученых Института Рефракционной и Катарактальной хирургии Цюрихского Университета (Швейцария) под руководством профессора Seiler T. [244, 247, 248]. Широкое применение в мировой практике технология роговичного кросслинкинга получила в конце 90-х годов XX века.

По результатам проведенного исследования, в ходе которого после скарификации эпителия центральной зоны на роговицу был нанесен фотосенсибилизатор (рибофлавин) с последующим облучением УФ-излучением (длина волны 370 нм; плотность энергии 3 мВт/см²) в течение 30 минут, было установлено, что кросслинкинг роговицы может применяться у пациентов с целью остановки прогрессирования кератэктазии, либо развития кератоконуса [80, 114, 122, 141, 212, 224, 225, 245, 261]. Послеоперационные исследования, проведенные через 6-12 месяцев после процедуры (включая проверку остроты зрения, топографию роговицы, осмотр на щелевой лампе, определение плотности эндотелиальных клеток) позволили сделать вывод о том, что необходимость кератопластики у пациентов с выполненным кросслинкингом значительно снижается [9, 27, 73, 182, 213, 214, 216, 267].

В своих работах профессор Wollensak G. (2010) с помощью электронной микроскопии доказывает факт «склеивания» фибрилл и утолщения коллагеновых волокон в роговице после проведения

кросслинкинга, что приводит к повышению биомеханических свойств роговицы. В передних отделах стромы диаметр коллагеновых волокон достоверно повышался на 12%, в то время как в задних отделах стромы диаметр коллагеновых волокон увеличивался лишь на 4,5% [257, 258, 261, 266].

В исследованиях профессора Kanellopoulos J. (2012) представлены результаты наблюдений за пациентами с ранее не диагностированной формой кератоконуса, а также кератомилеза после проведения операции LASIK с последующим развитием ятрогенной кератэктазии в течение 25 месяцев после проведения процедуры кросслинкинга. По данным автора, проведение процедуры кросслинкинга после фоторефракционных операций приводит к стабилизации упруго-прочностных свойств роговицы и позволяет приостановить прогрессирование ятрогенной кератэктазии [107, 153, 154]. Подобные результаты можно встретить во множестве других работ [9, 49, 59, 81, 92, 120, 148, 150, 176, 263]. Так, в работах профессора Seiler T. и профессора Spoerl E. (1997) улучшение механических свойств роговицы после проведения процедуры роговичного коллагенового кросслинкинга представлено в процентном соотношении: ригидность человеческой роговицы возросла приблизительно на 300%. Повышение механической ригидности авторы связывают с фактом «склеивания» фибрил и увеличения толщины коллагеновых волокон [110, 144, 162, 168, 210, 230, 234].

В других экспериментальных исследованиях подтверждено двукратное повышение устойчивости роговицы после комбинированного воздействия рибофлавина и ультрафиолетового излучения к действию ферментов: пепсина, трипсина и коллагеназы. Данный биохимический эффект кросслинкинга обусловлен изменением структуры коллагеновых фибрилл [249]. Это и объясняет эффективность проведения процедуры кросслинкинга при лечении язвы роговицы, а также частично обуславливает остановку прогрессирования кератоконуса [82, 84, 86-88].

Необходимо отметить, что помимо повышения упруго-прочностных и биохимических свойств, процедура коллагенового кросслинкинга приводит к повышенной устойчивости роговицы к термическому воздействию [248]. Денатурация коллагена с разрушением ковалентных связей между молекулами в роговице, подвергшейся процедуре кросслинкинга, происходит при более высокой температуре [250].

Максимальный эффект коллагенового кросслинкинга роговицы с применением фотосенсибилизатора рибофлавина происходит в передних отделах стромы на глубине не более 300 мкм. Это связано с высокой степенью абсорбции УФ-излучения рибофлавином. Данный факт объясняет преимущественно переднюю локализацию зоны утолщения коллагеновых волокон, а также разницу к механическому и химическому воздействию между волокнами переднего и заднего отделов стромы [109-111, 145, 159, 243]. Следует учесть, что наиболее важную функцию в поддержании кривизны роговицы выполняют передние отделы стромы.

Клиническое применение роговичного кросслинкинга касается профилактики регрессии миопии и развития ятрогенной кератэктазии после проведения рефракционного оперативного лечения [246, 251, 252, 255]. В мировой литературе встречаются доклады об успешном использовании процедуры кросслинкинга у пациентов с ятрогенной кератэктазией после операции LASIK. С помощью данной методики удалось остановить прогрессирование данного осложнения, а также увеличить биомеханические свойства роговицы [13, 28, 72, 89, 92, 96, 168, 226, 228, 229].

С проблемой индуцированного кератоконуса столкнулись лазерные рефракционные хирурги, выполняющие операции лазерного *in situ* кератомилеза. В первую очередь это было вызвано тем, что сам факт формирования поверхностного лоскута приводит к ослаблению биомеханических свойств роговицы в среднем на 30% [53, 93, 112, 136, 153, 217, 222]. Поэтому именно при проведении операции LASIK было предложено проведение кросслинкинга роговицы после завершения абляции

по классической схеме. В настоящее время методика ультрафиолетового кросслинкинга нашла применение в технологиях операций LASIK, FemtoLASIK и получила название LASIK Extra [98, 99, 126, 183, 199, 200].

Однако нельзя не отметить работы, в которых говорится об установлении факта апоптоза кератоцитов в переднем отрезке стромы роговицы (на глубину до 50-100 мкм) уже через 4 часа после проведения роговичного кросслинкинга по описанной выше схеме [142].

С помощью конфокальной биомикроскопии было выявлено разрежение кератоцитов в передних отделах стромы, что свидетельствует об их апоптозе под воздействием УФ-излучения [273]. Степень гибели кератоцитов напрямую зависела от интенсивности последнего. Доказано, что в зависимости от дозы УФ-облучения, во время проведения процедуры кросслинкинга происходит повреждение кератоцитов на глубину до 300 мкм (при дозе облучения 5,4 мДж/см²). Постепенное восстановление популяции кератоцитов происходит в течение 6-12 месяцев за счет миграции клеток из неповрежденных участков. Кроме того, в первые дни после процедуры было выявлено исчезновение субэпителиальных нервов, частичное восстановление которых происходит только через 8-12 месяцев после процедуры.

Стоит обратить внимание на цитотоксический эффект, который оказывает УФ-излучение на эндотелий роговицы. Учитывая коэффициент абсорбции излучения в ткани человеческой роговицы в присутствии рибофлавина, было рассчитано, что при стандартной терапевтической мощности излучения (3 мВт/см²) на поверхности роговицы толщиной более 400 мкм, энергия на уровне глубоких слоев роговицы практически безопасна для эндотелия [118, 258, 274, 276]. Но нельзя не учитывать, что в случаях язвы роговицы, кератоконуса, а также исходно тонкой роговицы стандартные дозы излучения оказывают достаточно выраженный цитотоксический эффект на эндотелий роговицы [156, 161, 167, 198, 271, 275, 282]. В подобных случаях было предложено снижать мощность излучения, либо использовать альтернативные способы лечения. Однако, по мнению зарубежных

исследователей, в случаях с локальным истончением роговицы на ограниченном участке возможно применение стандартных методик, так как локальная потеря эндотелиальных клеток компенсируется за счет миграции клеток с соседних участков [90, 91, 101, 152, 196, 197, 270, 279].

С накоплением опытных данных о структурных изменениях, происходящих в роговице после кросслинкинга, была предложена технология ускоренного кросслинкинга [186, 190, 201, 204, 205, 240, 254].

Уже в 2012 году была разработана и внедрена в практику множества европейских клиник установка для проведения ускоренного кросслинкинга [113, 126, 157, 185, 188, 190, 255, 266]. Методика ускоренного кросслинкинга отличается от стандартной увеличенной мощностью УФ-излучения с одновременным снижением длительности воздействия. Она основана на том, что соотношение между мощностью и временем воздействия энергии представляет собой константу. Так, например, при лечении кератоконуса предложено проведение 10-минутной инстилляцией рибофлавина, затем воздействие на роговицу УФ-излучением мощностью до 30 мВт/см² в течение 3 минут. Другой особенностью методики ускоренного кросслинкинга стало более короткое время инстилляцией рибофлавина, за счет чего меньшее количество рибофлавина достигает эндотелия и снижается риск повреждения клеток, характерный для других методик кросслинкинга [191, 192, 205, 240, 254, 268, 280, 281].

Согласно результатам проведенных исследований, биомеханические свойства роговицы после проведения процедуры ускоренного кросслинкинга не отличались от аналогичных после кросслинкинга по стандартному протоколу. О том же свидетельствуют результаты наблюдений пациентов в течение одного года после указанных вмешательств [126]. Клинические испытания позволили предположить, что последствия влияния процедур стандартного и ускоренного кросслинкинга на состояние роговицы идентичны.

Однако, согласно последним исследованиям, классическая методика проведения роговичного кросслинкинга дает лучшие результаты по сравнению с ускоренным кросслинкингом [113]. Отмечено, что самое высокое уменьшение максимальной рефракции роговицы и астигматизма было получено в результате проведения классического кросслинкинга, а регресс кератоконуса наблюдался в 33% случаев при классической методике против 20% при ускоренной методике.

Вышеизложенное подтверждается также рядом других исследований, предложены доказательства того, что более высокая плотность энергии при проведении ускоренного кросслинкинга (свыше 10 мВт/см²) обуславливает меньший биомеханический эффект по сравнению со стандартным протоколом проведения роговичного кросслинкинга (3-5 мВт/см²) [205]. Причиной этому может служить потребление кислорода и исключение отдельной стадии фотохимических реакций в роговице во время процедуры. В результате, сокращение времени обработки УФ-излучением и увеличение плотности энергии не могут гарантировать эффективность процедуры и остановку прогрессирования осложнений после фоторефракционных оперативных вмешательств [146, 149, 151, 205].

Нельзя не отметить работы отечественного ученого профессора Анисимова С.И. (2008) в данном направлении. Суть метода заключается в локальном изменении ригидности отдельных участков роговицы путем ограниченного воздействия ультрафиолетовым излучением на определенные участки роговицы¹. Методика получила название Локолинк (LCCL). Данный способ позволяет не только влиять на биомеханические свойства отдельных участков роговицы, но и оказывает рефракционный эффект, сходный с эффектом, оказываемым радиальной кератотомией, термокератокоагуляцией или имплантацией интрароговичных сегментов [8, 9].

¹Анисимов С.И. Способ лечения кератоконуса воздействием ультрафиолетового излучения и устройство для его осуществления (варианты). – Патент РФ на изобретение № 2391078 с приоритетом от 14.08.2008 г. Оpubл. 20.02.2010 г.

В ходе экспериментальных работ звездообразный или решетчатый пучок УФ-излучения проецировался на пропитанную рибофлавином роговицу в течение 5 минут. На обработанной роговице проявляется фотолитографический эффект, который обладает высокой точностью (до нескольких микрон) и разрешением. Автор методики отмечает в своих работах, что на неподвижном объекте прецизионность воздействия соизмерима с длиной волны используемого излучения. Стоит отметить, что помимо локального воздействия с целью снижения механического напряжения и улучшения биомеханических свойств отдельных участков роговицы (в случаях локальной эктазии после операции LASIK, например) LCCL применялся для коррекции аномалии рефракции. Для локального ослабления рефракции использовали облучение в виде круговых сегментов, а с целью усиления рефракции требовалось использовать радиальные зоны облучения. При этом основные параметры проведения данной процедуры оставались неизменными и соответствовали протоколу стандартного кросслинкинга.

Другим направлением в исследовании роговичного кросслинкинга стала замена фотосенсибилизатора. Так, одним из вариантов выбора стал бенгальский розовый. Стоит отметить, что глубина проникновения бенгальского розового в строму роговицы не превышает 100 мкм, а степень абсорбции УФ-излучения выше таковой у рибофлавина и составляет примерно 95%. Данные наблюдения позволяют сделать следующий вывод: основное количество коллагеновых сшивок в строме роговицы после проведения кросслинкинга с бенгальским розовым будет сосредоточено в передних отделах стромы роговицы [121]. Следующей отличительной чертой роговичного кросслинкинга с бенгальским розовым можно считать то, что биомеханические свойства роговицы после процедуры кросслинкинга несколько выше, чем у роговицы после кросслинкинга с рибофлавином [106], что обусловлено преимущественно поверхностным расположением коллагеновых сшивок. Как известно, именно передние отделы роговицы

несут на себе основную механическую нагрузку. Также стоит отметить, что процедура кросслинкинга роговицы с бенгальским розовым не оказывает столь пагубного влияния на жизнеспособность кератоцитов, что связано с большим коэффициентом абсорбции УФ-излучения у бенгальского розового, а также особенностью его локализации в передних отделах стромы (в сравнении со стандартной процедурой кросслинкинга с рибофлавином). Исследования роговичного кросслинкинга с бенгальским розовым продолжаются.

1.3. Преимущества применения ультрафиолетового лазерного излучения при полимеризации различных материалов без и с фотосенсибилизаторами для усиления эффекта кросслинкинга

Вопросы взаимодействия лазерного излучения с веществом интересовали ученых с самого появления лазеров. В основном изучалось воздействие мощного инфракрасного лазерного излучения на металлы [66]. В конце 70-х – начале 80-х годов, в связи с коммерческим распространением эксимерных лазеров, возник большой интерес к изучению взаимодействия УФ-излучения с веществом. Первыми возможностями полимеризации материалов его с помощью занялись профессор Srinivasan R и доктор Kawamura Y. еще в 1982 году. В своих исследованиях они описывали результаты воздействия лазерного излучения на поверхность различных полимеров. Данные работы послужили отправной точкой развития лазерного кросслинкинга и лазерной полимеризации с применением эксимерных лазерных установок [156, 236, 237, 239].

В 1986 году профессор Hockensmith J.W. с соавт. применил и описал возможность полимеризации нуклеиновых кислот под действием ультрафиолетового лазерного излучения [147]. Эмпирическим путем профессором и его командой были рассчитаны оптимальная длины волны

(245-280 нм) и достаточная мощность лазерного излучения, необходимые для возникновения сшивок между мономерами нуклеотидов.

Данное направление продолжило свое развитие, и уже в 1989 году опубликованы результаты исследования об изменении адгезивных свойств РЕЕК-полимера при помощи лазерного излучения. Дальнейшее развитие отражено в работе той же группы авторов уже в 1998 году, в которой было предложено несколько заключений: прочность полимера возрастает после воздействия на него лазерным излучением; поверхность полимера после лазерного воздействия становится более гладкой; лазерное воздействие субпороговыми энергиями абляции индуцирует значительное увеличение упруго-прочностных свойств образцов [119, 120].

В 1992 году профессор Thomas D.W. с соавт. опубликовал результаты своих исследований, посвященных различным методам модификации поверхности поливинилхлорида [241]. Основным направлением данных исследований было изучение влияния различных длин волн и плотности энергии эксимерлазерного излучения на получение эффекта кросслинкинга. На основании опубликованных исследований можно отметить, что наиболее выраженные изменения поверхности полимера были достигнуты при воздействии лазерного излучения с длиной волны 193 нм и плотностью энергии 0,11-0,15 Дж/см². При этом на поверхности облучаемых образцов возникали конусовидные и волнообразные изменения, т.н. эффект свеллинга.

Уже 2004 году в Лазерном Исследовательском Центре Ирана коллективом ученых доказано, что после обработки высокими дозами лазерного излучения (5,2 Дж/см²) происходит не только модификация поверхности, но и увеличение прочностных свойств образцов полимерных материалов. Воздействие лазерного излучения с различной плотностью энергии на поверхность полимера позволило влиять на его биомеханические и структурные сдвиги. Используя различные длины волн и плотность энергии лазерного излучения, проведено множество экспериментальных исследований в попытках обнаружить необходимые параметры для

получения наиболее выраженных изменений упруго-прочностных свойств испытуемых образцов [106, 107, 127, 128, 147, 160, 189, 215, 253, 278]. Было выявлено, что диапазон оптимальных длин волн для лазерной полимеризации является 190-215 нм, при этом необходимая мощность и плотность энергии лазерного излучения зависят от непосредственной молекулярной структуры конкретного образца.

Другим направлением развития лазерного кроссликинга стало применение фотосенсибилизаторов. В 1994 году опубликованы исследования механических свойств полимерных поверхностей, сформированных с помощью лазерного излучения. Отмечена разница между полимеризацией поверхности без и с фотосенсибилизатором: наличие фотосенсибилизатора на поверхности образца в процессе лазерной полимеризации позволило достичь более высоких показателей упруго-прочностных свойств итогового полимера [85, 129, 134, 135], что не могло не повлечь за собой дальнейших исследований в этом направлении. Лазерная модификация и полимеризация стали широко применяться в промышленности и кибернетике, что не могло не привлечь внимания к данному явлению со стороны медико-биологических исследователей.

Явление лазерного кроссликинга вызвало большой интерес со стороны ученых и привело к дальнейшим исследованиям возможностей его применения [17, 18]. Были опубликованы результаты исследования, в которых говорится о возможности лазерной полимеризации биоматериалов. Так, группой ученых подробно изучено влияние лазерного излучения на полилактид (PLA) без и с фотосенсибилизатором. Доказано, что в результате воздействия лазерного излучения с плотностью энергии 5 мДж/см² и наличием фотосенсибилизатора возникает эффект кроссликинга. Исследования в данном направлении позволили выявить не только механические сдвиги после проведения кроссликинга, но и возникновение новых поверхностных структур [68-70, 143, 257].

Эффектом кроссликинга биополимеров также заинтересовались ученые из Бостонского Медицинского Университета. Были опубликованы результаты исследования, в котором подробно описан лазериндуцированный кроссликинг белковых структур (ксенопсин, ангиотензин, интерлейкин) [215, 278]. Отмечено, что после воздействия лазерного излучения (длина волны 260 нм, плотность энергии 1,3 мДж/см²) между ароматическими белковыми цепями молекул образуется ковалентная связь. При этом, также, был выявлен повреждающий фактор белковых структур УФ-излучением [147, 160, 189].

На сегодняшний день большое количество исследовательских групп проводят исследования в этом направлении. Лазериндуцированный кроссликинг привлек внимание кардиологов, офтальмологов, стоматологов. Однако существует также ряд вопросов о необходимости и целесообразности проведения лазерного кроссликинга, на примере существующих методик химического, фотохимического и ультрафиолетового кроссликинга.

Впервые идеей сравнения лазерного и лампового кроссликинга ученые задались еще в 1991 году. В Институте Молекулярной Биологии Болгарской Академии Наук проведено исследование, в ходе которого было выявлено образование комплекса между белками ДНК и РНК посредством УФ-облучения [226]. Однако формирование сшивок при использовании стандартного источника УФ-излучения может занимать достаточно длительное время, поэтому исследователями было предложено использовать монохроматическое УФ-лазерное излучение. В ходе экспериментов было доказано, что методика лазерного кроссликинга позволяет значительно сократить длительность процедуры. Позднее в данном направлении большой объем работ и исследований в отношении различных полимеров были проведены польским ученым Szech Z. из Польского Института Органической химии [119, 120]. На примере акрилового адгезива было доказано, что применение УФ-лазерного излучения позволяет значительно ускорить время проведения кроссликинга, а также получить лучшие механические свойства,

чем при использовании стандартных источников УФ-излучения. Исследование также показало, что использование фотосенсибилизатора в процессе полимеризации дает значительную прибавку к упруго-прочностным свойствам полученного полимера [135].

В другом исследовании, при сравнительном описании кросслинкинга с помощью лазера и кросслинкинга с использованием стандартных источников УФ-излучения был затронут важный аспект, касающийся повреждающего фактора УФ-излучения белковых структур [162, 165]. Согласно полученным данным, повреждение белковых структур при использовании УФ-лазерного излучения значительно менее выражено, чем при использовании стандартного источника УФ-излучения, ввиду меньшего воздействия по временным показателям. Стоит отметить, что данный аспект был замечен и экспериментально подтвержден целым рядом авторов, что не может не свидетельствовать о явном преимуществе лазериндуцированного ультрафиолетового излучения над излучением, полученным при помощи стандартных ламповых источников. Другим неоспоримым преимуществом лазериндуцированного ультрафиолетового излучения является процент и плотность полученных сшивок. Согласно полученным данным, благодаря плотности и монохроматичности лазерного излучения, после проведения процедуры лазерного кросслинкинга количество сшивок в белковом полимере оказалось выше, чем после проведения кросслинкинга с использованием стандартных источников ультрафиолетового излучения [187, 232, 278].

Согласно приведенным выше исследованиям, можно сделать следующие выводы о преимуществах УФ-лазерного излучения над УФ-излучением, полученным при помощи стандартных источников:

- более короткое время воздействия;
- плотность воздействия лазерного излучения обеспечивает качественно большее количество сшивок в обрабатываемом полимере за равный (или даже меньший) промежуток времени;

– повреждающее действие лазериндуцированного УФ-излучения значительно ниже, чем у УФ-излучения, полученного при помощи стандартных источников;

– упруго-прочностные свойства образцов после лазериндуцированного кросслинкинга оказываются значительно выше, чем у образцов после стандартного УФ-кросслинкинга.

Все вышеизложенное указывает на перспективность применения лазерного излучения в качестве воздействующего фактора при проведении кросслинкинга.

1.4. Обоснование целесообразности кератоабляции с рибофлавином для фотопротекции в фоторефракционной хирургии

В медицине фотопротекция является широким понятием, которое подразумевает комплекс мероприятий, направленных на уменьшение воздействия УФ-излучения на клетки, ткани, органы и весь организм человека. Глаз человека, как уникальный орган, призванный преобразовывать попадающий в него световой поток в зрительное восприятие, несет наибольшую УФ-нагрузку в течение всей жизни. Роговая оболочка является не только главной преломляющей структурой глаза, но и первым барьерным фотопротекторным спектральным фильтром на пути светового потока, к сетчатой оболочке глаза. Именно этой функции роговицы и возможности её изменении после лазерных кераторефракционных операций не уделяется должного внимания. При этом упускается принципиально важный момент, что после удаления части стромы нарушается естественная барьерная функция роговицы, как спектрального фотопротекторного фильтра задерживающего УФ-излучение. Кроме того, в случаях фоторефракционной кератэктомии роговица получает дополнительную УФ-нагрузку, которая может негативно сказаться на

ответной воспалительной, регенераторной реакциях и повлиять на конечный рефракционный эффект [27-30].

Индукцированное абляцией вторичное УФ-излучение приводит к излишнему накоплению перекисных радикалов. Эти радикалы оказывают повреждающее действие на кератоциты и тканевые структуры стромы роговицы, могут провоцировать избыточную асептическую воспалительную и регенераторные реакции. Это приводит к развитию различной интенсивности субэпителиальной фиброплазии. В свою очередь, интенсивность фиброплазии предопределяет прозрачность роговицы и нередко сопровождается регрессом достигнутого рефракционного эффекта. В итоге развивается фиброплазия с различной степенью выраженности возвратной регенераторной миопии [31-35].

Все эксимерлазерные рефракционные операции на роговице создают условия УФ-нагрузки на роговицу с накоплением в её строме перекисных радикалов, причем оно тем больше, чем больше объём фоторефракционной абляции. Избыток перекисных радикалов инициирует развитие послеоперационной асептической воспалительной реакции [184, 185, 202, 230]. Она значительно меньше при выполнении абляции после предварительного формирования поверхностного роговичного лоскута на ножке при операции эксимерлазерного *in situ* кератомилеза (LASIK). Однако наиболее выраженная воспалительная реакция развивается при проведении поверхностной фоторефракционной кератэктомии (ФРК). Вот почему именно при проведении ФРК нередки случаи неадекватной ответной регенераторной реакции с формированием различной степени выраженности фиброплазии и возвратной регенераторной миопизации. Фиброплазия, как правило, развивается субэпителиально, преимущественно в поверхностных слоях стромы роговицы. В клинике выделяют обратимую, частично обратимую и необратимую формы субэпителиальной фиброплазии, развивающуюся преимущественно в течение первого месяца после фоторефракционной операции [25]. В большинстве случаев

субэпителиальная фиброплазия является обратимой и быстро исчезает при правильном медикаментозном послеоперационном лечении. Однако в ряде случаев она носит частично обратимый характер. Именно возможность развития частично обратимой и необратимой формы субэпителиальной фиброплазии с регрессом рефракционного эффекта является основным недостатком технологии ФРК, особенно в случаях высоких степеней аметропий. Как показывают клинические наблюдения при выполнении повторной ФРК, когда объем удаляемой ткани и корригируемая остаточная рефракция небольшие, имеет место прозрачное заживление роговицы с хорошими рефракционными результатами [12].

Отклонения от запланированной рефракции, из-за неадекватной ответной регенерации, имеют место даже при выполнении фоторефракционной абляции по технологии LASIK. Кроме того, в редких случаях, но возможно развитие асептической реакции в виде диффузного ламелярного кератита. Наконец, после операции LASIK возникают такие ситуации, когда развивается индуцированный кератоконус, не смотря на, казалось бы, достаточную расчетную остаточную толщину роговицы в зоне абляции [111, 139, 149].

Leo G. с соавт. (2013) при разработке фотопротекции на основе применения рибофлавина в эксимерлазерной рефракционной хирургии основной акцент был сделан на поверхностную фоторефракционную кератэктомию. Данная технология рассматривается многими лазерными рефракционными хирургами как наиболее щадящий вариант ослабления биомеханических свойств роговой оболочки. Такой подход приобретает важное практическое значение при исходно тонкой роговице, особенно в случаях сочетания с миопией высокой степени [172].

Предпосылкой к применению в качестве фотопротектора рибофлавина послужили данные о его защитных свойствах для эндотелия роговицы при проведении кросслинкинга, по стандартной, ускоренной и локальной технологии облучения УФ-излучением. Рибофлавин в концентрациях 0,1 и

0,25% не вызывал никаких побочных токсических и аллергических реакций [108, 112, 114].

Это связано со способностью рибофлавина поглощать УФ-фотоны. Согласно данным литературы, после насыщения роговицы рибофлавином при кросслинкинге роговичного коллагена поглощение ближнего ультрафиолета (А) увеличивается в пять раз и только менее 10% проникает сквозь пропитанную рибофлавином строму роговицы. Рибофлавин обладает фотопротекторным эффектом, предотвращая при кросслинкинге апоптоз кератоцитов и заднего эпителия роговицы. При экспериментальных исследованиях было показано, что через 1 сутки после проведения кросслинкинга после воздействия различными дозами УФ-излучения в диапазоне мощности от 0,75 до 4 мВт/см² в предварительно насыщенных рибофлавином роговицах кроликов отмечается замедленный тип апоптоза кератоцитов на разной глубине стромы. Кроме того, рибофлавин выступает как фотосенсибилизатор, способный инициировать эффект кросслинкинга при поглощении УФ-фотонов [134, 135].

Всё вышеизложенное указывает на целесообразность применения рибофлавина для защиты слоёв стромы роговицы от вторичного излучения, индуцированного абляцией.

1.5. Переход от лазериндуцированного рефракционного кератомоделирования и кросслинкинга к лазериндуцированному кросслинкингу при кератоабляции с рибофлавином в фоторефракционной хирургии

Согласно «Дрезденскому» протоколу, процедура стандартного кросслинкинга занимает достаточно длительное время (до 1 часа), что не может не вызывать определенный дискомфорт и жалобы у пациентов [7, 9, 11, 114, 123, 139, 140, 152, 158, 176, 178, 179, 184]. С целью снижения времени процедуры была разработана альтернатива – ускоренный

кросслинkinг, который, однако, имея очевидное временное преимущество, исходя из проведенных исследований, отличался незначительным улучшением биомеханических свойств роговицы, а также ярко выраженным цитотоксическим эффектом ввиду повышения ультрафиолетовой нагрузки на кератоциты [113, 157, 201, 205].

Другой, альтернативный метод – Локолинк – не обеспечивает достаточного улучшения биомеханических свойств роговицы ввиду малой площади воздействия. Однако он вполне может быть применим в случаях локальной эктазии, либо с целью коррекции аномалии рефракции [8, 9].

Основными предпосылками для разработки и проведения лазерного кросслинkinга могут служить основные недостатки как стандартной, так и ускоренной методики проведения процедуры роговичного кросслинkinга:

- длительность процедуры (в случае стандартного кросслинkinга по «Дрезденскому» протоколу);
- недостаточное повышение упруго-прочностных свойств роговицы после воздействия (в случае ускоренного кросслинkinга);
- повреждение белковых структур и кератоцитов роговицы вследствие повышенной ультрафиолетовой нагрузки;
- воспалительно-экссудативная реакция с возможным развитием помутнений в роговице и снижением точности планируемого фоторефракционного эффекта.

Необходимо учитывать, что все виды современных фоторефракционных операций на роговице связаны с испарением части ее стромы, что сопровождается ослаблением ее биомеханических свойств [13, 28, 35, 67, 72, 92, 103, 104, 168, 171, 184, 211, 226]. Так, наиболее популярное на сегодняшний день оперативное лечение аномалии рефракции, LASIK, обладает рядом недостатков, среди которых ведущее место занимает ослабление упруго-прочностных свойств роговицы вследствие формирования роговичного лоскута [30, 112, 136, 148, 153, 154, 164]. Согласно мировым исследованиям, только при формировании роговичного

лоскута, биомеханические свойства роговицы снижаются в среднем на 30-35% [105, 176, 217, 222]. Что, в свою очередь, не может не быть поводом для развития послеоперационных осложнений.

Стоит отметить, что роговая оболочка является не только главной преломляющей рефракционной структурой глаза, но первым барьерным фильтром на пути светового потока. Барьерная спектральная функция роговицы проявляется, прежде всего, в блокировании УФ-излучения ниже 290 нм, а также в снижении световой и УФ-нагрузки на хрусталик. Необходимо принять во внимание и тот факт, что при проведении фоторефракционной абляции с последующим кросслинкингом УФ-нагрузка на роговицу возрастает многократно. Это не может не повлиять на ответную экссудативно-регенераторную реакцию, от которой зависит конечный рефракционный эффект. Более того, при ускоренном кросслинкинге суммарная энергетическая УФ-нагрузка на роговицу остаётся такой же, как и при стандартной методике. Важно, что облучению подвергается уже истонченная после фоторефракционной абляции роговица. Уменьшение толщины роговицы в ее центральном оптическом отделе может стать причиной более интенсивной световой и УФ-нагрузки на хрусталик и привести к более раннему развитию катаракты [94].

На основании исследований последствий кросслинкинга на состояние роговицы на клеточном уровне, возникла необходимость в альтернативном способе проведения данной процедуры [22, 33].

Исследования по лазерному рефракционному кератомоделированию были начаты еще в 1987 году в МНИИ глазных болезней им. Гельмгольца, которые представляют несомненный научный и практический интерес для изучения механизмов, лежащих в основе рефракционного

кератомоделирования без коагуляции и абляции ткани роговицы лазерным излучением различного спектрального диапазона² [37-43].

Эксперименты в этом направлении позднее были продолжены с проведением ряда исследований в Институте теплофизики СО АН СССР (Новосибирск) и Научно-исследовательском центре по техническим лазерам АН СССР (Троицк) [39]. В 1991-2000 годах исследования выполнялись в МНТК «Микрохирургия глаза» и Институте общей физики РАН с акцентом на возможность применения для рефракционного кератомоделирования лазерного излучения инфракрасного диапазона. При этом применялось инфракрасное лазерное излучение в диапазоне длин волн от 1,44 до 2,89 мкм в энергетических дозах, лежащих ниже порога коагуляции ткани роговицы [40, 43, 46, 47].

Согласно литературным данным, возможности кератомоделирования субабляционными дозами УФ-излучения изучались с помощью эксимерных лазеров на ArF (193 нм), KrCL (223 нм) и KrF (248 нм). Для каждого вида излучения были определены плотности энергии в импульсе. Применялись различные режимы и методики облучения. Лазерное воздействие осуществлялось в одних случаях только по периферии, в других в параоптической или в центральной оптической зоне роговицы. Лазерные аппликации наносились в виде точек, диска, сектора, кольца, эллипса, радиально, тангенциально и при различных их комбинациях [42, 100].

Профессором Корниловским И.М. с соавт. в 1990 году было предложено рассматривать роговую оболочку как сложный биополимер со своеобразной гидроколлоидной структурой. Предположено, что биомеханические свойства роговицы определяют перекрестно-сшитые

² Корниловский И.М., Ражев А.М. Способ изменения биомеханических свойств роговичной ткани. – Авт. свид-во СССР на изобретение № 1781875 с приоритетом от 05.10.1989 г.

Корниловский И.М., Ражев А.М. Способ изменения биомеханических свойств роговицы. – Авт. свид-во на изобретение СССР № 1781885 А1 с приоритетом от 05.10.1989 г.

структуры её стромы. Причём, если уровень перекрёстного сшивания определяется средней молекулярной массой коллагена, протеогликанов и гликопротеинов, то плотность поперечных сшивок предопределяет такие свойства роговицы, как степень набухания, проницаемость, диффузию и, в конечном итоге, механическую прочность и эластичность [34, 36, 45, 48]. Строма роговицы была представлена как гидрофильный поперечно-сшитый биополимер, который способен формировать нерастворимую объемную сеть. Объемная структура данной сети является результатом поперечных сшивок в коллагене, протеогликанах и гликопротеинах. В норме сеть остается в равновесии со свободной и связанной водой, и при этом наблюдается баланс эластичных сил поперечно-сшитых биополимеров стромы роговицы с осмотическими силами её тканевой жидкости. Имеющиеся в литературе данные указывают на то, что при изменении состава межклеточного вещества появляется возможность воздействовать на форму и объём ткани. Применительно к роговице всё будет зависеть только от того, как будет изменена молекулярная масса в определенном её участке под влиянием фотонов лазерного излучения различного спектрального диапазона [40, 41].

В настоящее время в различных научных лабораториях изучаются эффекты лазерного воздействия на полимероподобные среды, которые приводят к перераспределению вещества на микроуровне. При этом изменение количества самого вещества либо отсутствует вообще, либо не является существенным. Эти процессы получили название лазерной полимеризации, агрегации (сшивки) макромолекул, а также лазерного свеллинга [16, 70].

Явления полимеризации и деполимеризации под влиянием лазерного излучения, хорошо изученные на различных полимерных материалах [77, 160, 189, 215, 253], имеют место и при воздействии на роговицу лазерным излучением различной интенсивности и спектрального диапазона. Более того, из опубликованных данных известно, что пептидные связи в коллагене являются акцептором УФ излучения с абсорбционным максимумом в

диапазоне 180-190 нм. Для протеогликанов и гликопротеинов абсорбционный пик приходится на 190 нм. Необходимо отметить, что при воздействии УФ излучения на биополимер возможно как образование сшивок, так и разрыв макромолекул и межмолекулярных связей [165, 166].

В зависимости от применяемой длины волны и режима воздействия субабляционными дозами УФ излучения эксимерных лазеров отмечался керато моделирующий эффект различной степени выраженности, сопровождающийся изменением кривизны передней поверхности роговицы и её рефракции. Характер лазериндуцированных изменений кривизны роговой оболочки и её рефракции были неоднозначными. Так, в зависимости от вида излучения, режима воздействия и топографии лазерных аппликаций, отмечался прямо противоположный характер лазериндуцированных изменений в кривизне передней поверхности роговицы и её рефракции [54, 57, 58].

Профессором Корниловским И.М. с соавт. в 2008 году предложено исследовать явление лазерного кросслинкинга с целью разработки альтернативы существующему методу кросслинкинга для исключения цитотоксического эффекта на кератоциты и эндотелий роговицы с одновременным повышением её упруго-прочностных свойств [37, 38, 41-46, 49, 53, 55, 56, 59-62, 180, 181].

Анализ имеющихся в литературе данных о спектре абляции роговицы показал, что, поглощаясь в строме, излучение эксимерного лазера с длиной волны 193 нм индуцирует вторичное излучение в ультрафиолетовом и видимом диапазонах, которое проникает гораздо глубже, чем аблируемый слой ткани [20, 193-195, 210, 236, 256]. Это излучение вызывает каскадную реакцию флюоресценции коллагеновых белков стромы, характер которой изменяется при переходе от эпителия к боуеновой оболочке и строме. Анализ спектра абляции роговицы и спектра абсорбции рибофлавина показал, что индуцированное абляцией вторичное излучение содержит диапазон длин волн (от 200 до 800 нм), поглощение которых рибофлавином

стромы роговицы может вызывать эффект кросслинкинга. Причем спектры абляции эпителия, боуеновой оболочки и стромы имеют различия (Рисунок 1).

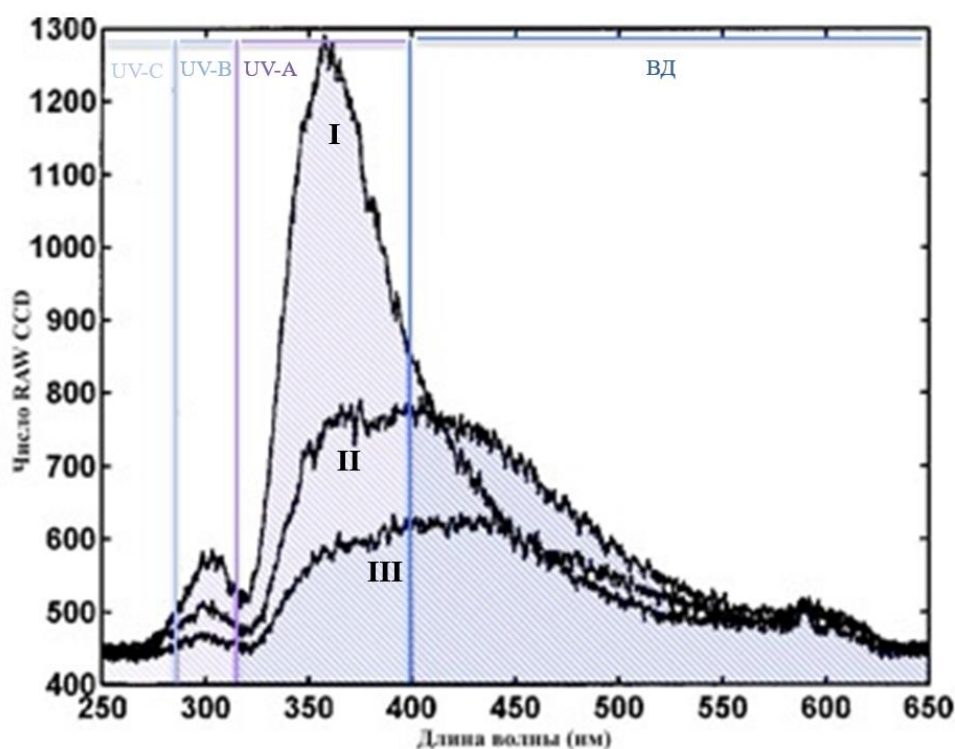


Рисунок 1 – Спектры излучения эпителия (I), боуеновой оболочки (II) и стромы (III) при абляции роговицы излучением эксимерного лазера с длиной волны 193 нм (по Cohen D. с соавт., 2001)

При этом интенсивность вторичного излучения в диапазоне 200-315 нм (UV-C и UV-B) составляет около 20% от общей интенсивности при высокой плотности лазерного излучения (>2 Дж/см²) и около 50% при умеренной плотности излучения (<500 мДж/см²). Именно умеренная плотность излучения (120-250 мДж/см²) применяется в эксимерлазерных офтальмологических установках различных производителей. Так, в случаях применения плотностей эксимерлазерного излучения менее 1 Дж/см² при абляции роговицы, кожи и дентальной ткани суммарная плотность вторичного излучения в УФ дальнем (UV-C) и среднем (UV-B) спектральных диапазонах на их поверхности составляет 10 мДж/см² [130, 241].

В абляционном спектре роговицы имеются средний (UV-B) и ближний УФ (UV-A) диапазоны. Причем, при абляции эпителия отмечается наибольший пик UV-A излучения, соответствующий длинам волн 365 нм, которые используются в клинической практике для проведения процедуры кроссликинга. Однако внимание привлекает средний UV-B диапазон, при поглощении высокоэнергетических фотонов которого рибофлавином отмечаются наивысшие по значению коэффициенты экстинкции. Так, в диапазоне длин волн от 200 до 280 нм (UV-C) наблюдается коэффициент экстинкции не менее $10000 \text{ л} \times \text{моль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$. Кроме того, в этом же диапазоне отмечается еще два высоких пика: на длине волны 220 нм с коэффициентом экстинкции $27000 \text{ л} \times \text{моль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ и на длине волны 265 нм с коэффициентом экстинкции $30000 \text{ л} \times \text{моль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$. В данном диапазоне длин волн УФ излучения суммарный коэффициент экстинкции оказывается в среднем в 3 раза выше, чем при применении УФ излучения ближнего спектрального диапазона. В свою очередь, в диапазоне длин волн от 330 до 475 нм происходит поглощение с коэффициентом молярной экстинкции не менее $5000 \text{ л} \times \text{моль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$. В этом диапазоне имеется два пика с коэффициентом экстинкции до $10000 \text{ л} \times \text{моль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ при длине волны 370 и 440 нм (Рисунок 2).

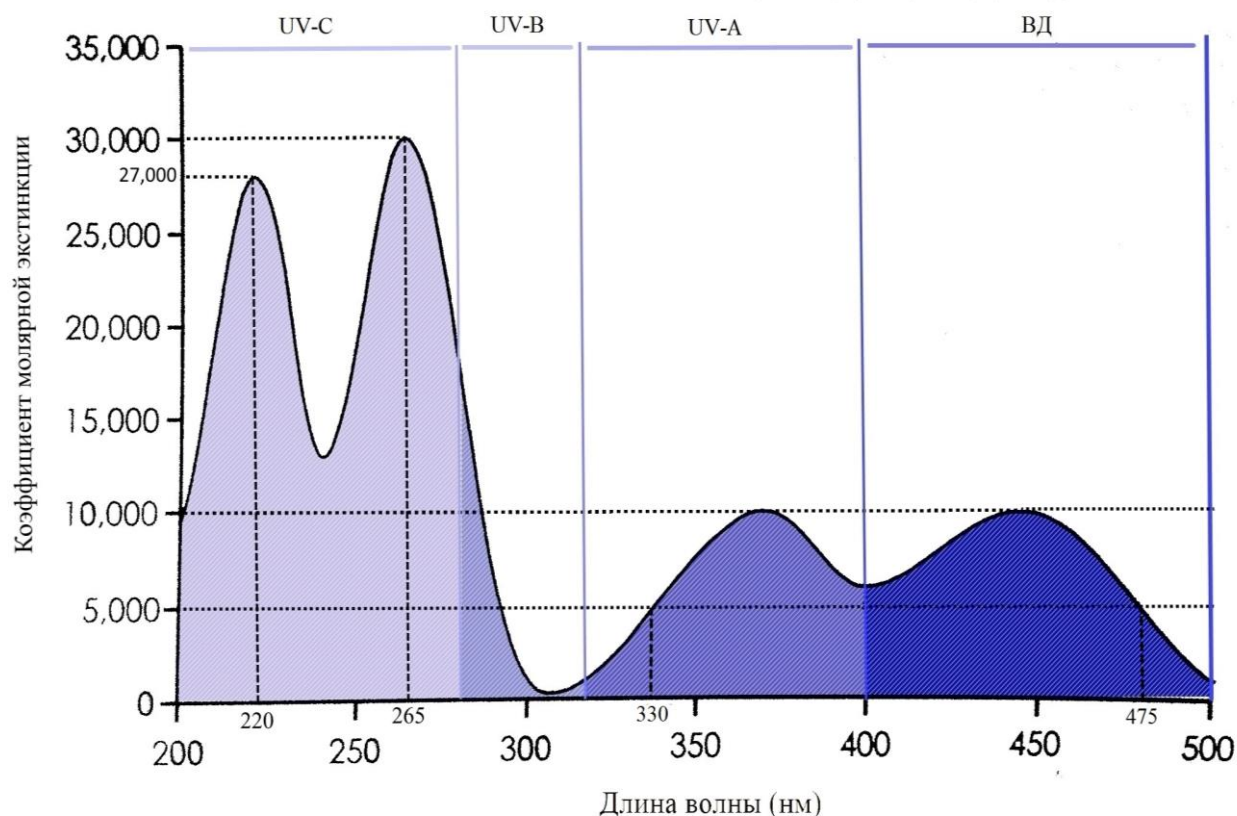


Рисунок 2 – Спектр поглощения рибофлавином световых фотонов с коэффициентами молярной экстинкции от 5000 до 10000 л × моль⁻¹ × см⁻¹ и максимальными пиками поглощения 27000 -30000 л × моль⁻¹ × см⁻¹ в дальнем ультрафиолете (по Владимирову Ю.А. и Потапенко А.Я., 2006)

Другими словами, возникновение эффекта кросслинкинга с коэффициентом экстинкции, достаточным для возникновения сшивок, может быть достигнуто в довольно широком диапазоне длин волн. Лазериндуцированное вторичное излучение содержит диапазон UV-B и UV-A излучений, которые, поглощаясь в насыщенной рибофлавином строме, способны формировать сшивки в коллагеновых структурах роговой оболочки. Причем, исходя из затухающего эффекта поглощения стромы, насыщенной рибофлавином, наибольшее количество сшивок будет образовываться непосредственно в слое, прилежащем к зоне абляции [115, 116, 193-195, 238, 239]. Более того, необходимо принять во внимание и импульсный характер воздействия вторичного излучения, индуцированного эксимерлазерной абляцией. Предпосылкой к этому явились исследования, в которых было показано повышение эффекта кросслинкинга при импульсном

(по сравнению с непрерывным) облучении УФ-А (370 нм) [117, 165, 201, 240]. При импульсном воздействии лучше реоксигенация стромы. Это является важным моментом, поскольку в цепочке реакций кросслинкинга необходим кислород, который, переходя в активную синглетную форму, непосредственно участвует в формировании сшивок в коллагеновых структурах роговицы.

Таким образом, анализ литературы свидетельствует, что в настоящее время наиболее распространенным методом воздействия на ослабленную роговичную ткань является ее укрепление посредством кросслинкинга. Однако на сегодняшний день исследования, посвященные изучению последствий процедуры кросслинкинга на состоянии роговицы на клеточном уровне, оставляют под вопросом целесообразность повсеместного применения данной процедуры. Кроме того, анализ литературных данных показал наличие альтернативного источника УФ-излучения, возникающего непосредственно в ходе фоторефракционной кератоабляции, а также возможность его применения для достижения эффекта кросслинкинга (в случае предварительного насыщения стромы роговицы раствором рибофлавина) без дополнительной УФ-нагрузки на роговицу в послеоперационном периоде. Решению этого вопроса, а также последующей комплексной морфофункциональной и клинической оценке и посвящена данная работа.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Общая характеристика экспериментального материала и дизайн исследования

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 Митотехнологии 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) (Рисунок 3).



Рисунок 3 – Препарат для общей анестезии животных Золетил 100 (Zoletil 100), Вирбак Санте Анималь (Virbac Sante Animale), 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.

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 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 2.1 (контрольная, <i>ex vivo</i>) – 10 интактных роговиц 10 кроликов;</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:</p> <p>подгруппа 2.3А – 5 глаз 5 кроликов после трансФРК с предварительным насыщением рибофлавином;</p> <p>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>

2.2. Методики экспериментальных исследований

2.2.1 Методика лазериндуцированного кросслинкинга роговицы при эксимерлазерной абляции с рибофлавином в экспериментах *ex vivo* и *in vivo*

Целью данной главы явилась разработка в экспериментах *ex vivo* и *in vivo* методики фоторефракционной кератэктомии с фотопротекцией и эффектом кросслинкинга. Для этого необходимо было решить следующие задачи:

- разработать новую методику проведения фоторефракционной кератоабляции на примере трансэпителиальной ФРК (трансФРК);
- решить вопрос о способе и длительности насыщения стромы роговицы изотоническим 0,25% раствором рибофлавина в ходе трансФРК.

Для решения вышеуказанных задач был предложен следующий

алгоритм трансэпителиальной ФРК с фотопротекцией и эффектом кросслинкинга:

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

Для аэрозольного насыщения использовался ультразвуковой небулайзер V.Well WN114 (Великобритания) с мембранно-сетчатой (MESH) технологией диспергирования раствора (Рисунок 4).



Рисунок 4 – Ингалятор электронный мембранно-сетчатый V.Well WN-114 (Великобритания)

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» (Рисунок 5).

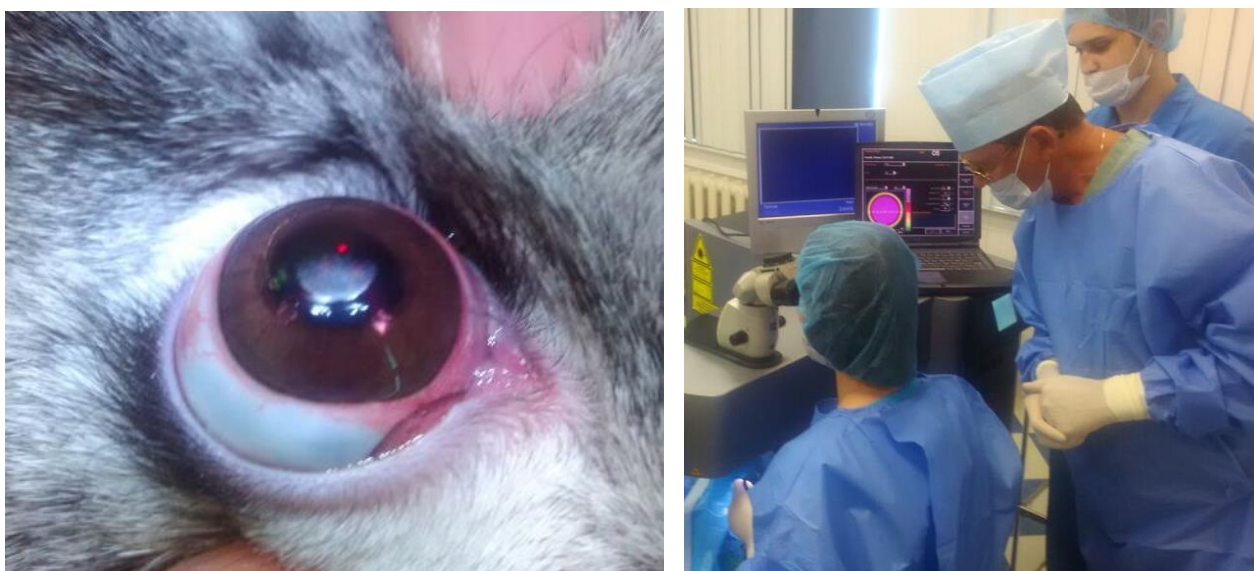


Рисунок 5 – Процесс выполнения дозированной эксимерлазерной абляции роговицы на эксимерлазерной офтальмологической установке Wavelight-Allegretto 200 (США)

2.2.2. 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-е, 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 (Таблица 2).

Таблица 2 – Журнал ведения данных текущего клинического офтальмологического статуса экспериментального животного, с их последующей оценкой по средне-балльной системе

Клиническая картина	Правый глаз					Левый глаз				
	Дата осмотра									
	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день
Слезотечение	2	1	0	0	0	2	1	0	0	0
Светобоязнь	2	1	0	0	0	2	1	0	0	0
Эрозия эпителия	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Характер эпителизации	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Состояние эпителия	-	2	2	1	1	1	1	1	1	1
Отёчность стромы	1	1	1	-	0	1	0	0	0	0

Десцеметит	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Перикорнеальная инъекция	2	1	0	0	0	1	1	0	0	0
Особенности	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Общий балл оценки	10	5	3	1	1	8	4	1	1	1

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;

- особенности: к особенностям течения раннего послеоперационного периода следует отнести появление инфильтрации в роговичной строме любой локализации, гипопиона в передней камере, явления иридоциклита, кератоувеита, клиническая картина язвы роговицы, развитие десцеметоцеле и т.д.: 0 – клиническое течение без особенностей; 1 – появление инфильтрации в роговичной строме независимо от локализации; 2 – иридоциклит, 3 – кератоувеит.

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.

2.2.3. Методика биомеханического тестирования образцов роговиц

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

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.

По завершении абляции из каждого глаза путем выкраивания формировались роговично-склеральные лоскуты шириной 5 мм и длиной 16 мм, после чего помещались в герметичную влажную камеру, приготовленную на базе изотонического 0,9% раствора NaCl, с целью их последующей транспортировки в лабораторию тензиометрических испытаний.

Далее роговично-склеральные лоскуты, 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) (Рисунок 6). Исследования проводились в лаборатории химии и технологии материалов для сердечно-сосудистой хирургии в ФГБНУ «НЦССХ им. А.Н. Бакулева» (Москва).

При проведении тензиометрических испытаний для фиксации образцов в разрывной машине применялись винтовые губки с металлической насечкой, конструкция которых препятствует скольжению и передавливанию роговично-склеральных лоскутов.

Разрывная длина образцов после установки в зажимы составляла 3 мм и включала в себя оптическую зону роговицы (Рисунок 7). 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.



Рисунок 6 – Тензиометрическая установка Zwick/Roell BZ 2.5 /TN1S (Германия)

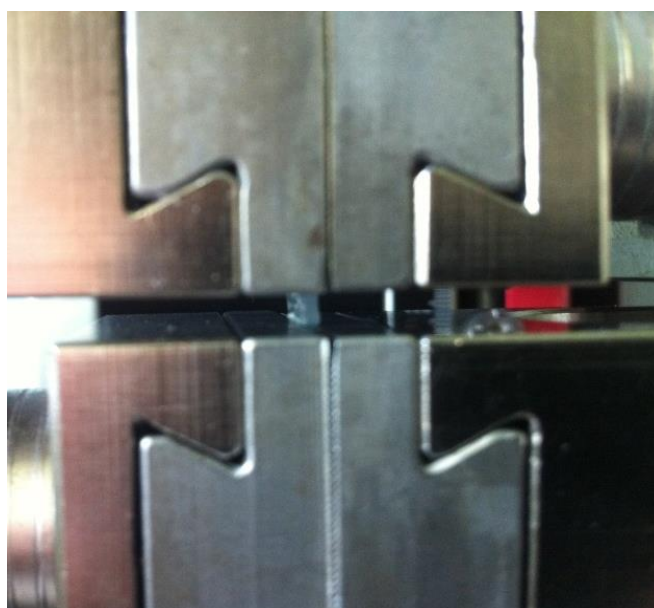


Рисунок 7 – Роговично-склеральный лоскут, установленный в зажимы тензиометрической установки Zwick/Roell BZ 2.5 /TN1S (Германия)

Скорость испытания составляла 10 мм/мин, предварительная нагрузка на образцы – 0,008 Н, что обеспечивало линейное увеличение напряжения в роговично-склеральном лоскуте и позволило регистрировать весь диапазон нагрузок вплоть до его механического разрушения.

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

2.2.4. Методика световой микроскопии

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.

Патоморфологическое исследование проводилось на 1-е, 3-и и 7-е сутки после операции, по 2 пары глаз в каждый из указанных периодов соответственно.

Эвтаназия осуществлялась путем декапитации под зоветиловым наркозом, после чего глаза энуклеировались, отделялись роговично-склеральные лоскуты, предварительно разметив на них плоскость будущих срезов.

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 надетемпоральной 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 AxioScore A.1. Микрофотографирование выполняли камерой

высокого разрешения AxioCam MRc5, Carl Zeiss (Германия) с помощью программного обеспечения AxioVision.

2.2.5. 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 имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, а также в Центре фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

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.

Фиксация образцов осуществлялась 2,5% глутаровым альдегидом (сток – Glutaraldehyde, 25% EM grade, 10 x 10ml, Ted Pella 18426) на буфере Сёренсена в течение 6 часов при комнатной температуре. После фиксации – отмывка MQ (дистиллят 18.2 МОМ) пять раз по 3 минуты. Контрастирование мембран – 2% OsO₄ (Osmium Tetroxide, 4% aqueous, 10 x 10 ml, Ted Pella 18465) на MQ – 1 час при комнатной температуре при защите от света. После контрастирования – снова отмывка MQ.

Обезвоживание в спиртах восходящей концентрации:

- 50% EtOH – 10 минут,
- 60% EtOH – 20 минут,
- 70% EtOH – 12 часов на +4⁰C,
- 80% EtOH – 2 смены по 20 минут,
- 96% EtOH – 1 час,

- Ацетон – 1 час.

Далее произведена пропитка эпоксидными смолами (заливочная среда – Epon812: DDSA: MNA:DMP=9:6:4:0,23; далее – эпон):

- Ацетон:эпон=3:1 (v/v) - 2 часа,
- Ацетон:эпон=1:1 (v/v) - 2 часа,
- Ацетон:эпон=1:3 (v/v) - ночь при комнатной температуре,
- Эпон – двое суток при комнатной температуре.

Заливка: в резиновых формах и эппендорфах при 60⁰С в течение трёх суток.

Получение срезов выполнено с помощью ультратома Ultracut-E (Reichert-Jung, Австрия):

- полутонких: стеклянным ножом ~1 μm ; срезы переносились на предметное стекло, грелись на термостойке (60⁰С) до полного высыхания жидкости, красились 2% водным раствором толуидинового синего в течение 15 секунд на термостойке, промывались MQ (все растворы пропускались через 0,22 μm фильтр);

- ультратонких: пирамидки вырезались в областях интереса (определены на полутонких срезах); срезы изготавливались с использованием алмазного ножа (DiATOME Ultra Diamond Knife 45) ловились на бленду с формваровой подложкой (толщина среза – 140 нм, подложка сделана с помощью 0,3% раствора формвара в хлороформе).

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.

2.2.6. Методика проведения ультразвуковых и ОКТ-исследований в эксперименте

До и после проведения экспериментов *ex vivo* на всех глазах была выполнена ультразвуковая кератопахиметрия, которая осуществлялась на установке Nidek UP-1000 (Япония) (Рисунок 8).



Рисунок 8 – Ультразвуковой пахиметр Nidek UP-1000 (Япония)

В экспериментах *in vivo* каждому животному до и после абляции была выполнена оптическая когерентная томография (ОКТ) роговицы на томографе OPTOVUE RTVue-100 (США) (Рисунок 9).



Рисунок 9 – Процесс выполнения оптической когерентной томографии роговицы кролика в ходе эксперимента *in vivo* на томографе OPTOVUE RTVue-100 (США)

2.3. Методы статистической обработки экспериментального материала

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 $p < 0,05$.

ГЛАВА III. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЛАЗЕРИНДУЦИРОВАННОГО КРОССЛИНКИНГА ПОСЛЕ ЭКСИМЕРЛАЗЕРНОЙ АБЛЯЦИИ РОГОВИЦЫ С РИБОФЛАВИНОМ

Целями данной главы явились:

- 1) определение фотопротекторного эффекта после кератоабляции с рибофлавином;
- 2) тензиометрическая оценка упруго-прочностных свойств роговицы после фотоабляции с рибофлавином.

Для достижения поставленных целей было необходимо решение следующих задач:

- в экспериментах *in vivo* оценить особенности клинического течения у экспериментальных животных после проведения лазериндуцированного кросслинкинга при эксимерлазерной абляции с рибофлавином;
- в экспериментах *ex vivo* оценить биомеханические свойства роговицы после лазериндуцированного кросслинкинга при эксимерлазерной абляции роговицы без и с предварительным насыщением стромы роговицы раствором рибофлавина.

3.1. Особенности клиники лазериндуцированного кросслинкинга при эксимерлазерной абляции роговицы с рибофлавином в экспериментах *in vivo*

Для объективной оценки разницы заживления в раннем послеоперационном периоде все экспериментальные животные (32 кролика) были разделены на следующие группы:

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.

Клиническое течение послеоперационного периода при абляции на глубину 100 мкм (при осмотре животных из группы 1.1):

- на 1-е сутки после абляции средняя оценка глаз, на которых была осуществлена эксимерлазерная абляция с рибофлавином, составила $12 \pm 1,1$ баллов; в то время, как средний балл глаз, на которых абляция проводилась без предварительного насыщения стромы рибофлавином, равнялся $12,3 \pm 0,5$. В обоих вариантах наблюдались сильное слезотечение, умеренная светобоязнь, умеренное отделяемое. Эрозия эпителия составляла не менее 3/4 зоны абляции. Эпителий рыхлый, несостоятельный. Наблюдалась отечность стромы роговицы. Однако при абляции с предварительным насыщением стромы роговицы раствором рибофлавина отмечалась равномерная по всей окружности зоны абляции эпителизация. На глазах без предварительного насыщения стромы роговицы рибофлавином чаще всего эпителизация была неравномерной, очаговой с хаотичным расположением эпителия по всей зоне абляции;

- на 3-и сутки средний балл на глазах после абляции с рибофлавином составил $6,7 \pm 1,4$; в то время, как средний балл глаз после абляции без рибофлавина был равен $9,8 \pm 4,6$ баллов. При осмотре слезотечение на глазах после абляции с рибофлавином было слабым, светобоязнь практически отсутствовала. На глазах после абляции без рибофлавина сохранялись умеренное слезотечение, небольшое количество отделяемого, слабая светобоязнь. В обоих вариантах отмечена равномерная краевая эпителизация

по всей зоне абляции. Эрозия эпителия составляла не менее 1/2 зоны абляции. Сохранялась отечность стромы роговицы;

- на 7-е сутки после абляции в обоих случаях не наблюдались светобоязнь и слезотечение, отделяемого также не было. Средний балл на глазах после абляции с рибофлавином составлял $4,3 \pm 3,9$ баллов, на глазах после абляции без рибофлавина – $7,5 \pm 2,6$ баллов соответственно. В обоих вариантах отмечена равномерная краевая эпителизация по всей зоне абляции. Эрозия эпителия составляла не менее 1/2 зоны абляции. Сохранялась отечность стромы роговицы. При окрашивании роговицы раствором флюоресцеина глаз после абляции без предварительного насыщения стромы раствором рибофлавина в центральной зоне наблюдался выраженный дефект эпителия (Рисунок 10);

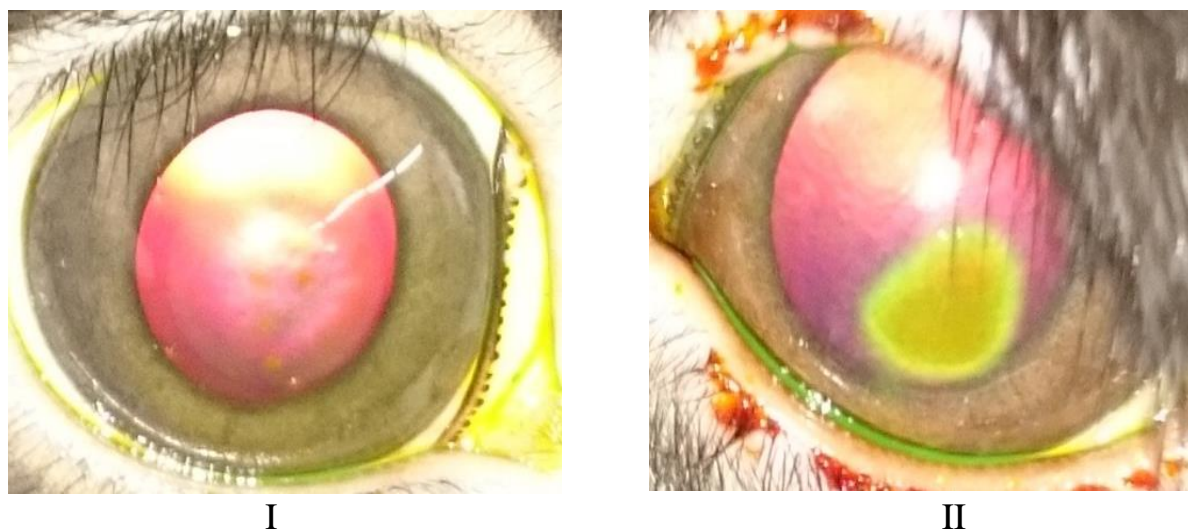


Рисунок 10 – Состояние роговицы глаза кролика через 7 дней после трансФРК на глубину по центру 100 мкм с рибофлавином (I) и без рибофлавина (II)

- на 14-е сутки после абляции средний балл на глазах после абляции с рибофлавином составил $3,2 \pm 1,9$ баллов и $6,3 \pm 2,6$ баллов – после абляции без рибофлавина. Слезотечения и светобоязни не выявлено. Наблюдалось небольшое количество отделяемого на глазах после абляции без рибофлавина. В обоих вариантах сохранялась неполная эпителизация роговицы, с выраженным дефектом эпителия не менее 1/3-1/4 зоны абляции в центральной оптической зоне. Эпителий рыхлый, поверхность ровная, слегка

утолщен в срезе. При окрашивании флюоресцеином наблюдалось 4-5 точек прокрашивания;

- на 21-е сутки после абляции средний балл оценки клинического состояния роговицы глаза после абляции с рибофлавином составил $3,8 \pm 1,0$ баллов; глаза после абляции без рибофлавина – $6,3 \pm 3,3$ баллов. Слезотечения и светобоязни не выявлено в обоих вариантах, сохранялась неполная эпителизация роговицы, с выраженным дефектом эпителия не менее 1/4 зоны абляции в центральной оптической зоне. Эпителий рыхлый, поверхность ровная, слегка утолщен в срезе. При окрашивании раствором флюоресцеина сохранялись небольшие зоны прокрашивания в центральной оптической зоне на глазах после абляции с рибофлавином. На глазах после абляции без рибофлавина, помимо дефекта эпителия в центральной оптической зоне, окрашивались 3-4 участка в параоптической зоне, на периферии зоны абляции. При осмотре сохранялась выраженная отечность стромы роговицы, равная площади абляции (Рисунок 11).



I



II

Рисунок 11 – Состояние роговицы глаза кролика на 21-е сутки после трансФРК глубину по центру 100 мкм с рибофлавином (I) и без рибофлавина (II)

Уже на ранних сроках послеоперационного периода полученные клинические данные позволили судить о проведенном избыточном объеме абляции в группе 1.1, что привело к возникновению ответной асептической воспалительно-регенераторной реакции, выраженной в появлении

множественных «хейзов», неполной эпителизации, устойчивом помутнении стромы роговицы на обоих глазах, а также сохранявшегося дефекта эпителия в центральной оптической зоне роговицы.

Клиническое течение послеоперационного периода при абляции на глубину 50 мкм (при осмотре животных из группы 1.2):

- на 1-е сутки после абляции средняя оценка глаз после абляции с рибофлавином составила $12,6 \pm 0,5$ баллов, в то время как средний балл глаз после абляции без рибофлавина был $12,7 \pm 0,5$. В обоих вариантах наблюдались сильное слезотечение, умеренная светобоязнь, умеренное отделяемое, выраженная отечность стромы. Эрозия эпителия составляла не менее 3/4 зоны абляции. Эпителий рыхлый, несостоятельный. Эпителизация равномерная, по всей окружности зоны абляции (Рисунок 12);

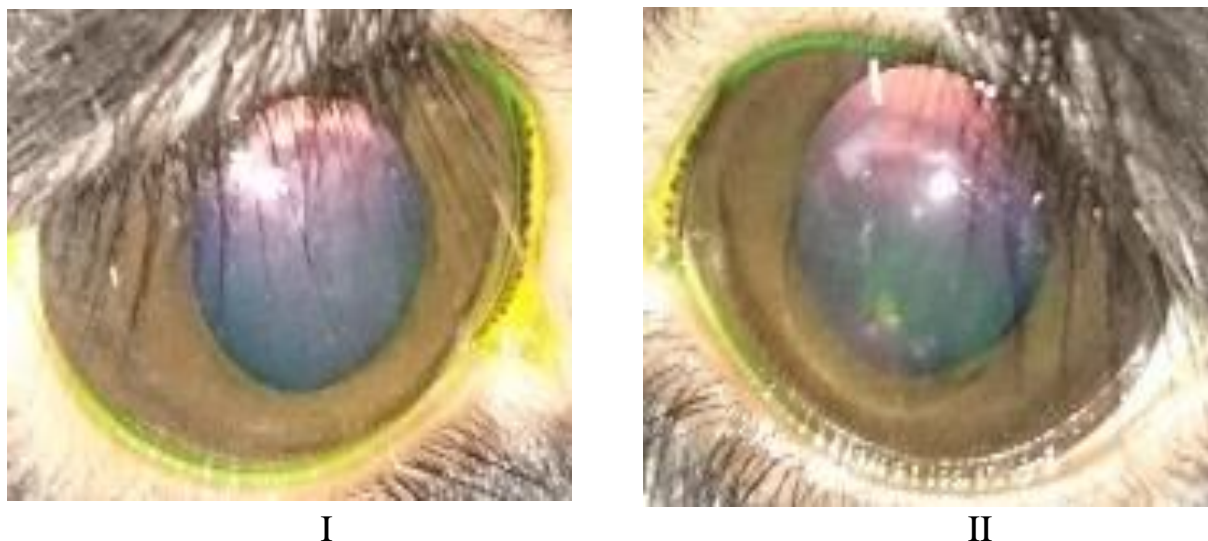


Рисунок 12 – Состояние роговицы глаза кролика на 1-е сутки после трансФРК на глубину по центру 50 мкм с рибофлавином (I) и без рибофлавина (II)

- на 3-и сутки после абляции при оценке клинических данных, полученных при осмотре животных, средний балл на глазах после абляции с рибофлавином составил $6,2 \pm 0,5$; в то время, как средний балл глаз после абляции без рибофлавина был равен $6,4 \pm 0,6$ баллов. При осмотре слезотечение на глазах после абляции с рибофлавином было слабым, светобоязнь практически отсутствовала. На глазах после абляции без

эпителизация роговицы. Эпителий рыхлый, поверхность ровная, слегка утолщен в срезе;

- на 21-е сутки после абляции средний балл оценки клинического состояния роговицы глаз после абляции с рибофлавином составил $1,3 \pm 0,5$ баллов; глаз после абляции без рибофлавина – $1,7 \pm 0,5$ баллов. Слезотечения и светобоязни не выявлено в обоих вариантах. Эпителизация роговицы полная, неравномерная в случае глаз после абляции без рибофлавина. При окрашивании раствором флюоресцеина прокрашивания в оптической и параоптической зонах не выявлено.

Отмечено, что на протяжении всего периода наблюдений, при обоих вариантах глубины абляции диагностирована разница в выраженности воспалительных и регенераторных процессов. Так, на глазах после абляции с рибофлавином все вышеперечисленные реакции проходили заметно менее выражено, о чем свидетельствуют среднебалльные оценки всех экспериментальных животных из обеих групп, что не может не свидетельствовать о фотопротекторных свойствах рибофлавина (Таблица 33, Рисунки 14 и 15).

Таблица 3 – Балльная оценка клинического состояния глаз кроликов после трансэпителиальной ФРК без и с предварительным насыщением стромы роговицы раствором рибофлавина в экспериментах *in vivo* ($M \pm \sigma$)

Показатели		Период после операции				
		1-е сутки	3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки
Группа 1.1.	Абляция на глубину 100 мкм с насыщением рибофлавином (n = 8)	12±1,1	6,7 ± 1,4	4,3 ± 3,9	3,2 ± 1,9	3,8 ± 1,0
	Абляция на глубину 100 мкм без насыщения рибофлавином (n = 8)	12,3±0,5	9,8 ± 4,6	7,5 ± 2,6	6,3 ± 2,6	6,3 ± 3,3
Группа 1.2	Абляция на глубину 50 мкм с насыщением рибофлавином (n = 8)	12,6±0,5	6,2 ± 0,5	1,7 ± 0,5	1,2 ± 0,4	0,8 ± 0,4
	Абляция на глубину 50 мкм без насыщения рибофлавином (n = 8)	12,7± 0,5	6,4 ± 0,6	1,7 ± 0,5	2,0 ± 0,1	1,9 ± 0,1

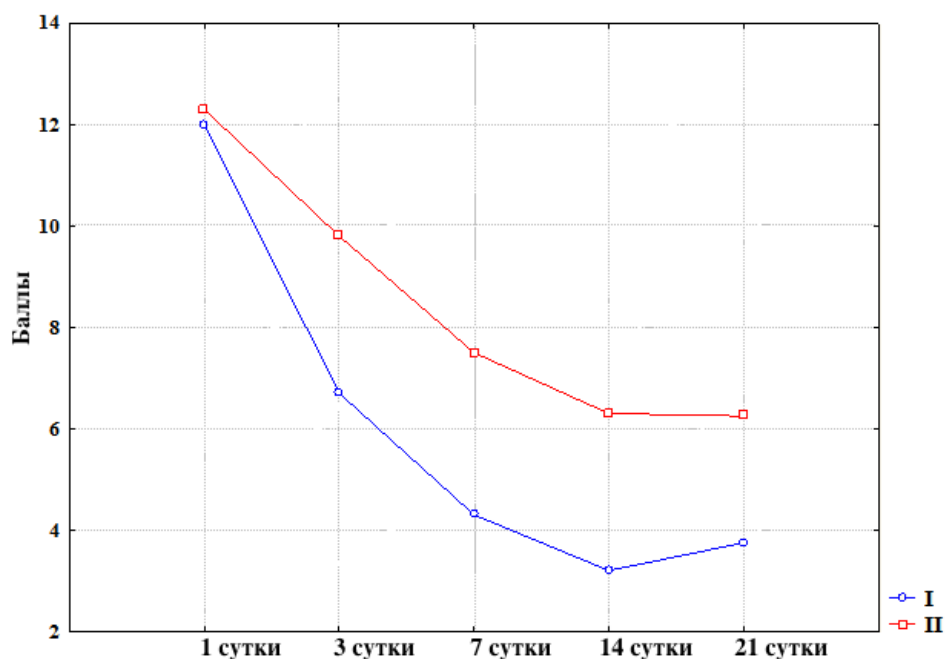


Рисунок 14 – Кривая распределения средних величин (M), полученных в ходе балльной оценки клинического состояния глаз кроликов (по 27-балльной шкале) после трансэпителиальной ФРК (глубина по центру 100 мкм) с предварительным насыщением стромы роговицы раствором рибофлавина (I) и без него (II)

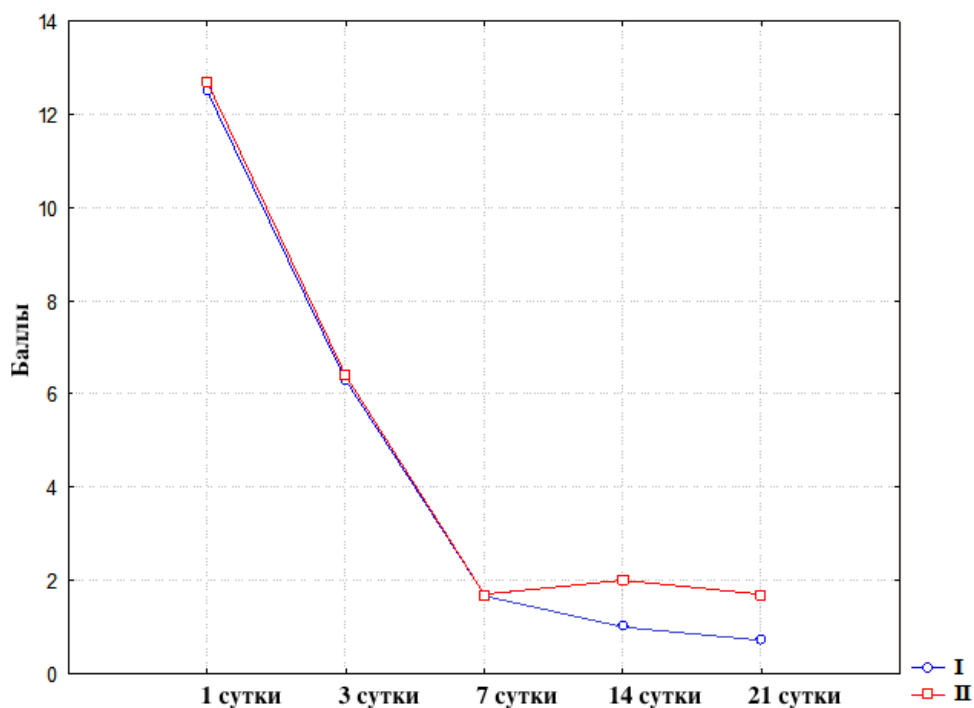


Рисунок 15 – Кривая распределения средних величин (M), полученных в ходе балльной оценки клинического состояния глаз кроликов (по 27-балльной шкале) после трансэпителиальной ФРК (глубина по центру 50 мкм) с предварительным насыщением стромы роговицы раствором рибофлавина (I) и без него (II)

Таким образом, на основании полученных в ходе эксперимента данных, можно сделать вывод о том, что наличие предварительного насыщения стромы роговицы 0,25% изотоническим раствором рибофлавина в ходе эксимерлазерной фоторефракционной абляции оказывает фотопротекторный эффект, который характеризуется снижением среднебалльной оценки клинического состояния глаз экспериментальных животных, а также слабовыраженной ответной асептической воспалительно-регенераторной реакцией.

3.2. Оценка биомеханических свойств роговицы после лазериндуцированного кросслинкинга при эксимерлазерной абляции роговицы без и с предварительным насыщением стромы роговицы раствором рибофлавина в экспериментах *ex vivo*

Для оценки упруго-прочностных свойств образцов роговиц кроликов до и после проведения лазериндуцированного кросслинкинга при эксимерлазерной абляции без и с предварительным насыщением стромы раствором рибофлавина в экспериментах *ex vivo* и *in vivo* были исследованы 42 глаза 42 кроликов породы шиншилла – группы 2.1, 2.2 и 2.3.

При эксимерлазерной абляции за основу был взят подход, при котором методика насыщения роговицы и сам раствор рибофлавина не оказывали значимого влияния на степень гидратации стромы. С этой целью был использован 0,25% раствор рибофлавина, который готовился на изотоническом 0,9% растворе NaCl, непосредственно перед абляцией.

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 4.

Таблица 4 – 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 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

При оценке биомеханических свойств аблированных образцов роговиц глаз экспериментальных животных, предварительно насыщенных рибофлавином, было отмечено повышение их биомеханических свойств по сравнению с аналогичными образцами, на которых абляция проводилась без насыщения рибофлавином.

Такие заключения были сделаны по результатам анализа таких упруго-прочностных свойств, как прочность при растяжении, сила на разрыв и модуль упругости (модуль Юнга) (Таблица 5).

Разница показателей биомеханических свойств (прочность при растяжении, максимальная сила при разрыве и модуль упругости (Юнга) образцов роговиц глаз экспериментальных животных после дозированной ФТК на глубину 100 мкм (в эксперименте *ex vivo*) и после трансФРК с абляцией в центре на глубину 50 мкм (в эксперименте *in vivo*) без и с предварительным насыщением стромы рибофлавином наглядно представлена на Рисунках 16-18.

Таблица 5 – 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 Группы	Прочность при растяжении (МПа)		Максимальная сила при разрыве (Н)		Модуль упругости (Модуль Юнга) (Н/мм ²)	
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	

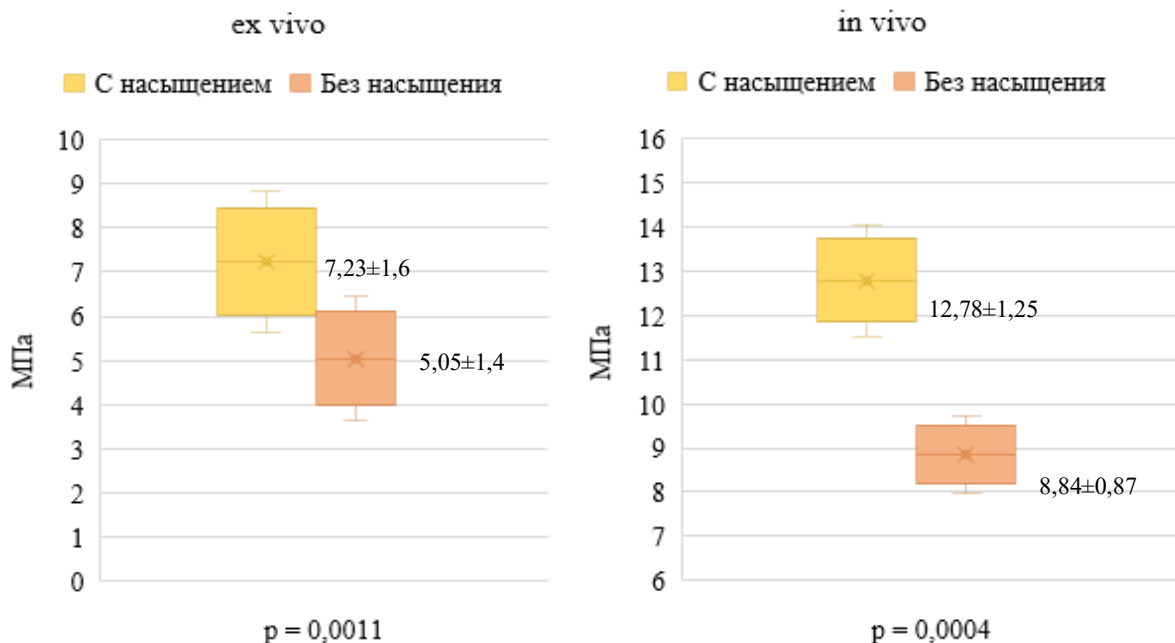


Рисунок 16 – Сравнительный график показателей средних величин прочности при растяжении ($M \pm \sigma$, мПа) роговиц кроликов после проведения кератоабляции без и с предварительным насыщением стромы 0,25% изотоническим раствором рибофлавина и глубиной абляции по центру 100 мкм (ex vivo) и 50 мкм (in vivo)

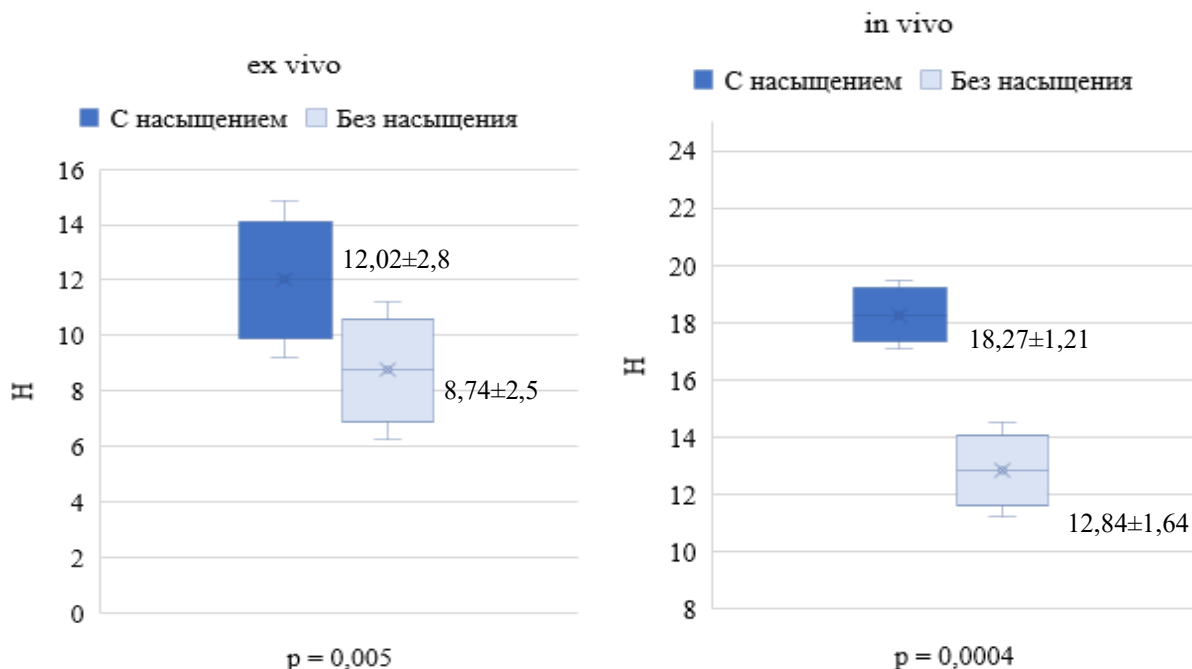


Рисунок 17 – Сравнительный график показателей средних величин максимальной силы при разрыве ($M \pm \sigma$, Н) роговиц кроликов после проведения кератоабляции без и с предварительным насыщением стромы 0,25% изотоническим раствором рибо флавина и глубиной абляции по центру 100 мкм (ex vivo) и 50 мкм (in vivo)

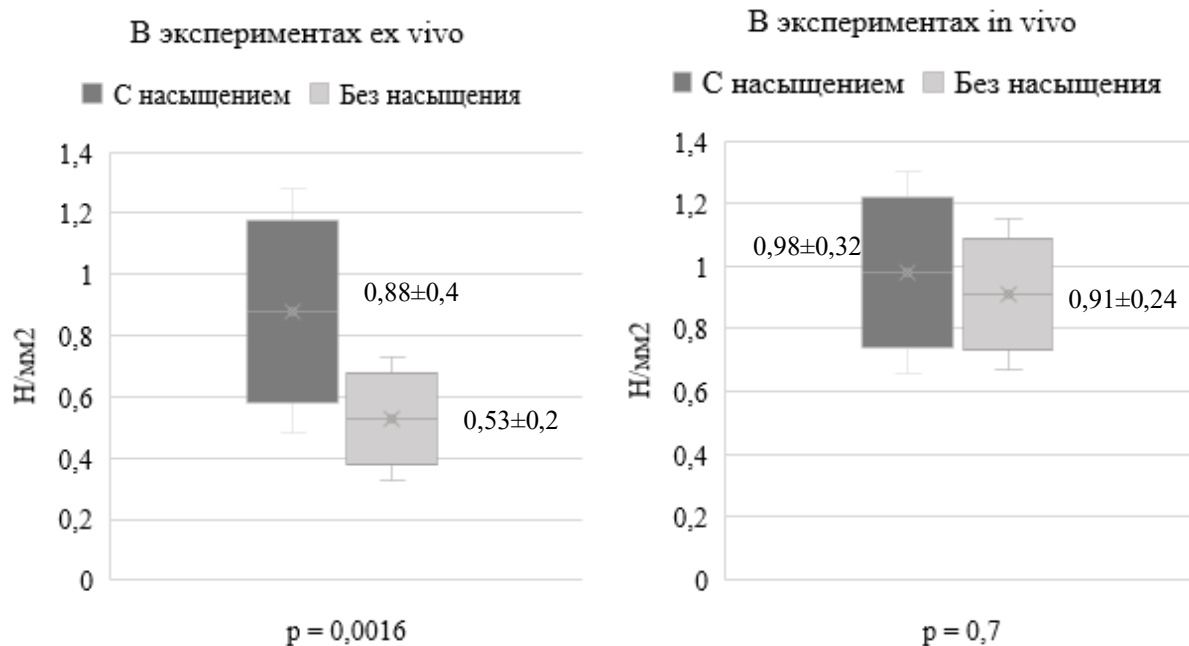


Рисунок 18 – Сравнительный график показателей средних величин модуля упругости (модуля Юнга) ($M \pm \sigma$, Н/мм²) роговиц кроликов после проведения кератоабляции без и с предварительным насыщением стромы 0,25% изотоническим раствором рибофлавина и глубиной абляции по центру 100 мкм (ex vivo) и 50 мкм (in vivo)

Таким образом, по данным тензиометрических испытаний в экспериментах ex vivo эффект увеличения биомеханических свойств роговиц был выявлен во всех без исключения образцах, в то время как в экспериментах in vivo не было получено достоверной разницы показателей модуля упругости (модуля Юнга) образцов роговиц экспериментальных животных после абляции без и с предварительным насыщением стромы раствором рибофлавина. Исследования посредством ультразвуковой пахиметрии, а также оптической когерентной томографии роговицы, не выявили влияния насыщения стромы 0,25% изотоническим раствором рибофлавина на точность и глубину абляции.

ГЛАВА IV. КОМПЛЕКСНАЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА РЕФРАКЦИОННОЙ КЕРАТОАБЛЯЦИИ С ФОТОПРОТЕКЦИЕЙ И ЭФФЕКТОМ КРОССЛИНКИНГА

Целями данной главы явились:

1) анализ морфологических изменений после лазериндуцированного кросслинкинга при эксимерлазерной абляции роговицы без и с рибофлавином в экспериментах *in vivo*;

2) подтверждение эффекта лазериндуцированного кросслинкинга при фоторефракционной абляции с рибофлавином посредством трансмиссионной электронной микроскопии.

Для достижения поставленных целей было необходимо решение следующих задач:

- по данным световой микроскопии в экспериментах *in vivo* оценить морфологические изменения после лазериндуцированного кросслинкинга при эксимерлазерной абляции роговицы без и с рибофлавином;

- оценить результаты электронно-микроскопического исследования ультраструктуры стромы роговиц после проведения эксимерлазерной абляции без и с предварительным насыщением рибофлавином.

4.1. Морфологические изменения после лазериндуцированного кросслинкинга при эксимерлазерной абляции роговицы без и с рибофлавином в экспериментах *in vivo* по данным световой микроскопии

Морфологические изменения по данным световой микроскопии образцов роговиц глаз экспериментальных животных на 1-е, 3-и и 7-е сутки после абляции на глубину 50 мкм без и с предварительным насыщением стромы 0,25% раствором рибофлавина представлены в Таблицах 6-8.

Таблица 6 – Качественное описание образцов роговиц кроликов на 1-е сутки после абляции (ТрансФРК) на глубину 50 мкм без и с предварительным насыщением стромы раствором рибофлавина

Предмет исследования	Группы исследуемых образцов			
	с насыщением рибофлавином (n=2)		без насыщения рибофлавином (n=2)	
	в области повреждения или ее проекции	вне области повреждения	в области повреждения или ее проекции	вне области повреждения
Эпителий роговицы	Отсутствует. Граница стромы выглядит узкой более эозинофильной линией. На границе поврежденной и нормальной роговицы количество слоев снижено вплоть до одного, происходит эпителизация с валом эпителизации	Заметно активное слущивание клеточных элементов рогового слоя	Отсутствует. Граница стромы выглядит узкой более эозинофильной линией. Эпителизация слабовыражена.	Заметно активное слущивание клеточных элементов рогового слоя с образованием скоплений эозинофильного материала на наружной поверхности роговицы
Наружные слои стромы	Наблюдается слабовыраженная инфильтрация сегментоядерным и гранулоцитами и активация отдельных кератоцитов. Толщина роговицы повышена, строма отечна	Строма несколько отечна	Наблюдается минимальная инфильтрация сегментоядерными гранулоцитами и активация отдельных кератоцитов, строма несколько отечна	Строма несколько отечна
Глубокие слои стромы	Без особенностей	Без особенностей	Без особенностей	Без особенностей

Таблица 7 – Качественное описание образцов роговиц кроликов на 3-и сутки после абляции (ТрансФРК) на глубину 50 мкм без и с предварительным насыщением стромы раствором рибофлавина

Предмет исследования	Группы исследуемых образцов			
	с насыщением рибофлавином (n=2)		без насыщения рибофлавином (n=2)	
	в области повреждения или ее проекции	вне области повреждения	в области повреждения или ее проекции	вне области повреждения
Эпителий роговицы	Эпителизация в ходу, во всех слоях новообразованного эпителия встречаются картины митозов. Эпителий содержит не менее трех слоев, клетки его высокие или кубические	Без особенностей	Неполная эпителизация, эпителий содержит менее трех слоев, клетки его плоские, слой новообразованного эпителия тонкий	Без особенностей
Наружные слои стромы	Следы воспалительной инфильтрации отсутствуют. Строма построена из рыхло лежащих коротких волокон тонковолокнистого коллагена, выглядящих разнонаправленными. Среди волокон большое количество активированных кератоцитов (клеточность стромы локально повышена на субъективный взгляд). Граница (базальная мембрана) эпителия и поверхностной стромы слабо прослеживается	Клеточность стромы не изменена, плотность кератоцитов не снижена, волокна без особенностей	Присутствуют следы воспалительной инфильтрации (отдельные нейтрофилы). Клеточность повышена, наблюдаются активные кератоциты. Волокна коллагена менее рыхлые и короткие, чем волокна в образцах с рибофлавином	Клеточность стромы не изменена, плотность кератоцитов не снижена, волокна без особенностей
Глубокие слои стромы	Клеточность стромы не изменена, плотность кератоцитов не снижена, волокна без особенностей	Клеточность стромы не изменена, плотность кератоцитов не снижена, волокна без особенностей	Клеточность стромы не изменена, плотность кератоцитов не снижена, волокна без особенностей	Клеточность стромы не изменена, плотность кератоцитов не снижена, волокна без особенностей

Таблица 8 – Качественное описание образцов роговиц кроликов на 7-е сутки после абляции (трансФРК) на глубину 50 мкм без и с предварительным насыщением стромы раствором рибофлавина

Предмет исследования	Группы исследуемых образцов			
	с насыщением рибофлавином (n=2)		без насыщения рибофлавином (n=2)	
	в области повреждения или ее проекции	вне области повреждения	в области повреждения или ее проекции	вне области повреждения
Эпителий роговицы	Эпителизация полная, правильная. Эпителий построен правильно, содержит 3 слоя клеток. Базальная мембрана выражена менее четко, чем в норме	Построен правильно, содержит 5-6 слоев клеток	Большая часть поверхности покрыта новообразованным правильно построенным эпителием (4 слоя клеток), однако в центре повреждения имеется узкий (670 мкм) неэпителизованный участок, окруженный валами эпителизации	Без особенностей
Наружные слои стромы	Рубцовая ткань умеренно выражена, наблюдаются активированные кератоциты, клеточность стромы повышена. Коллагеновые волокна стромы грубые, волнистые	Клеточность стромы не изменена, плотность кератоцитов не снижена, волокна без особенностей	Рубцовая ткань выражена слабо, волокна коллагена построены достаточно правильно, клеточность повышена незначительно, среди волокон встречаются отдельные активированные кератоциты	Клеточность стромы не изменена, плотность кератоцитов не снижена, волокна без особенностей
Глубокие слои стромы	Клеточность стромы не изменена, плотность кератоцитов не снижена, волокна без особенностей	Клеточность стромы не изменена, плотность кератоцитов не снижена, волокна без особенностей	Клеточность стромы не изменена, плотность кератоцитов не снижена, волокна без особенностей	Клеточность стромы не изменена, плотность кератоцитов не снижена, волокна без особенностей

Сравнение приведенных выше описаний привело к следующим результатам: 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. Описанные изменения роговиц представлены на Рисунках 19-21.

Остальные ткани исследованных глаз (сетчатка, хориоидея, склера и др.) – без особенностей.

Норма

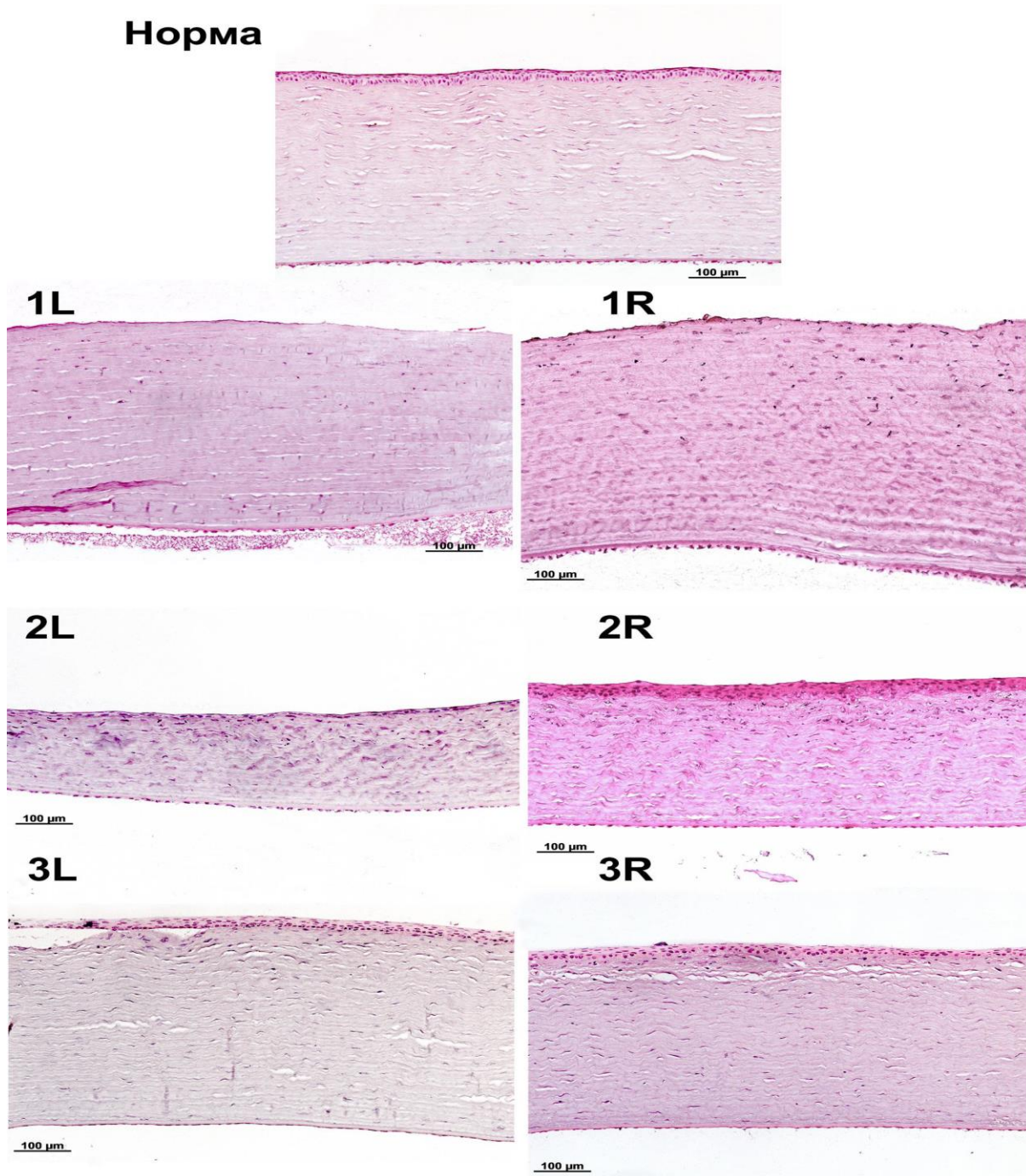


Рисунок 19 – Репрезентативные участки поперечных срезов роговиц кроликов на 1-е (1L, 1R), 3-и (2R, 2L) и 7-е сутки (3L, 3R) после абляции: L – абляция без рибофлавина; R – абляция с рибофлавином. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x200

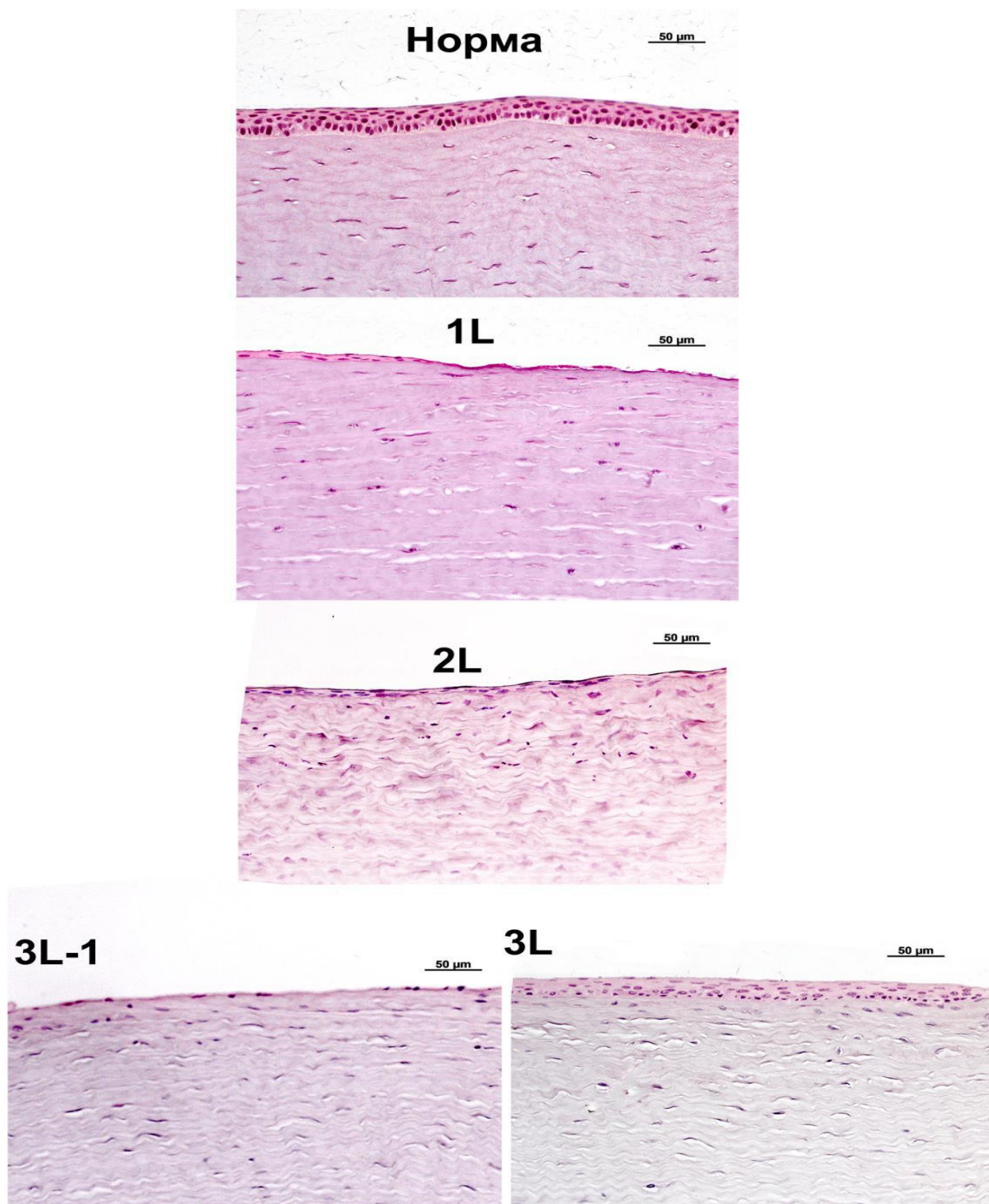


Рисунок 20 – Репрезентативные участки поперечных срезов роговиц глаз кроликов после абляции без рибофлавина на 1-е (1L), 3-и (2L) и 7-е сутки (3L) после абляции. Даны два варианта 3L для демонстрации полностью эпителизованного участка (3L) повреждения и еще неэпителизованного участка (3L-1). Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x400

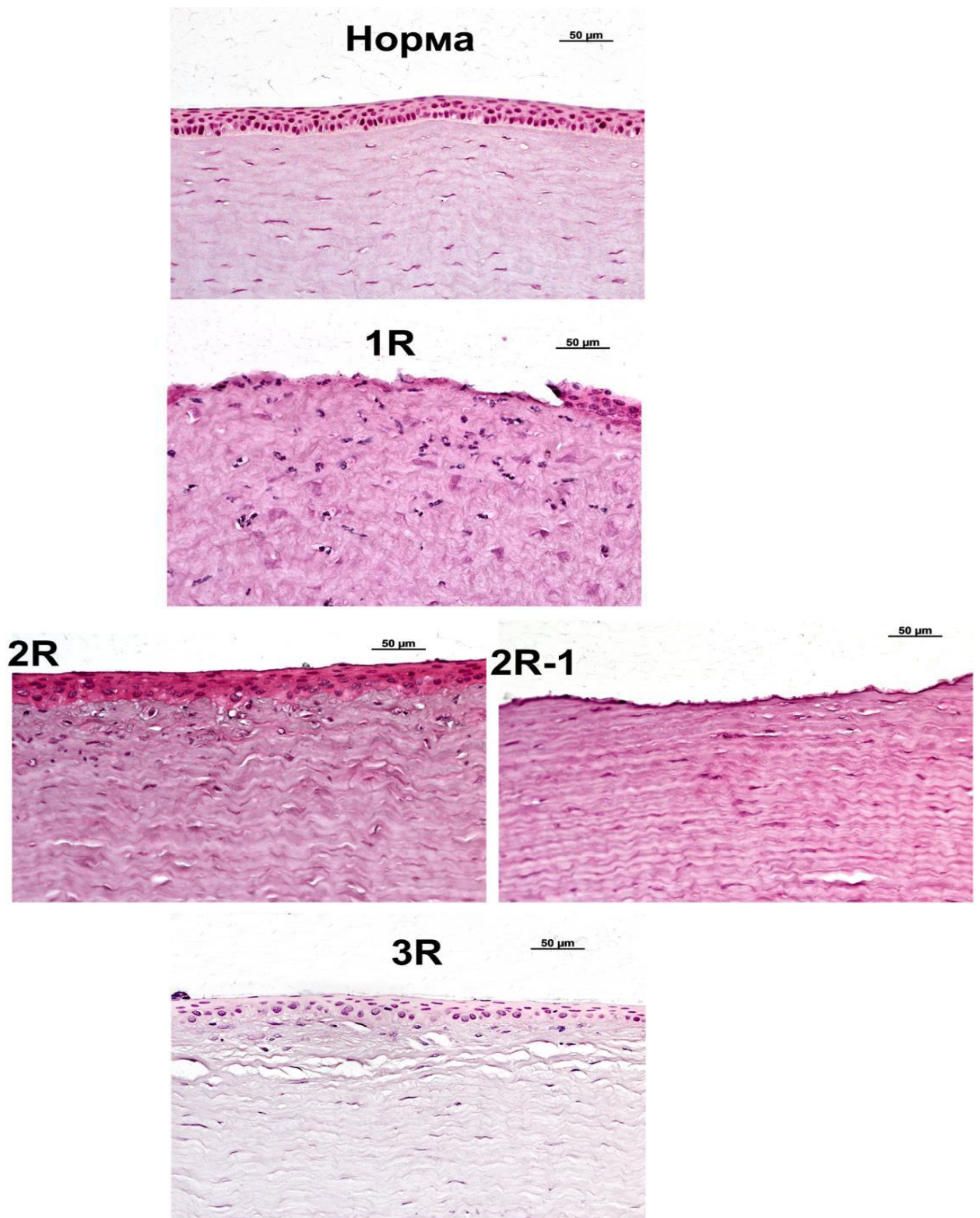


Рисунок 21 – Репрезентативные участки поперечных срезов роговиц глаз кроликов после абляции с рибофлавином на 1-е (1R), 3-и (2R) и 7-е сутки (3R) после абляции. Даны два варианта 2R для демонстрации полностью эпителизованного участка (2R) повреждения и еще неэпителизованного участка (2R-1). Окраска гематоксилином и эозином, увеличение x400

4.2. Результаты электронно-микроскопического исследования ультраструктуры стромы роговицы после проведения эксимерлазерной абляции без и с предварительным насыщением рибофлавином

Проведенные электронно-микроскопические исследования показали, что на светооптическом уровне роговицы глаз экспериментальных животных с полной эпителизацией и сохранением исходной морфологии плоского многослойного нероговевающего эпителия, с практически полным восстановлением стратификации слоев. В случае образцов после абляции с предварительным насыщением стромы раствором рибофлавина наблюдались единичные вакуоли в клетках базального слоя и появление псевдомногорядности (Рисунок 22).

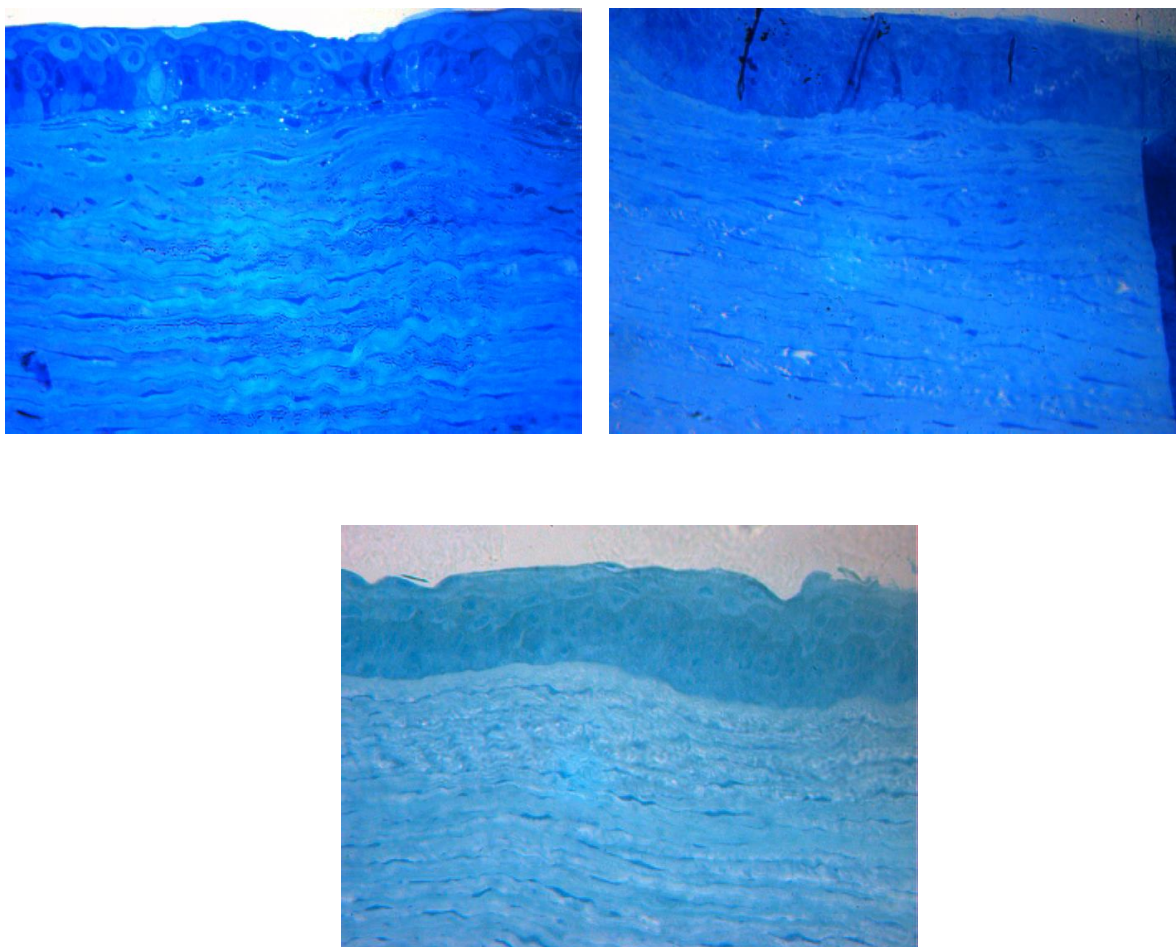


Рисунок 22 – Полутонкие срезы роговицы кроликов опытной группы 4.1 с насыщением стромы рибофлавином. Окраска толуидиновым синим. Увеличение x400

Строма представлена укладкой правильно ориентированных коллагеновых волокон без признаков отека, с умеренным количеством кератоцитов. В передних слоях роговицы в случаях после абляции с рибофлавином выявлен волнообразный ход стромальных волокон.

Во всех случаях наблюдается субэпителиальная фиброплазия различной степени выраженности.

Все выявленные морфологические особенности могут соответствовать исходу изменений, вызванных лазерным воздействием.

Роговицы кроликов из группы 4.2 (без предварительного насыщения стромы раствором рибофлавина) во всех случаях с полной эпителизацией, с сохранением исходной морфологии – плоского многослойного неороговевающего эпителия, с полным восстановлением стратификации слоев (Рисунок 23).

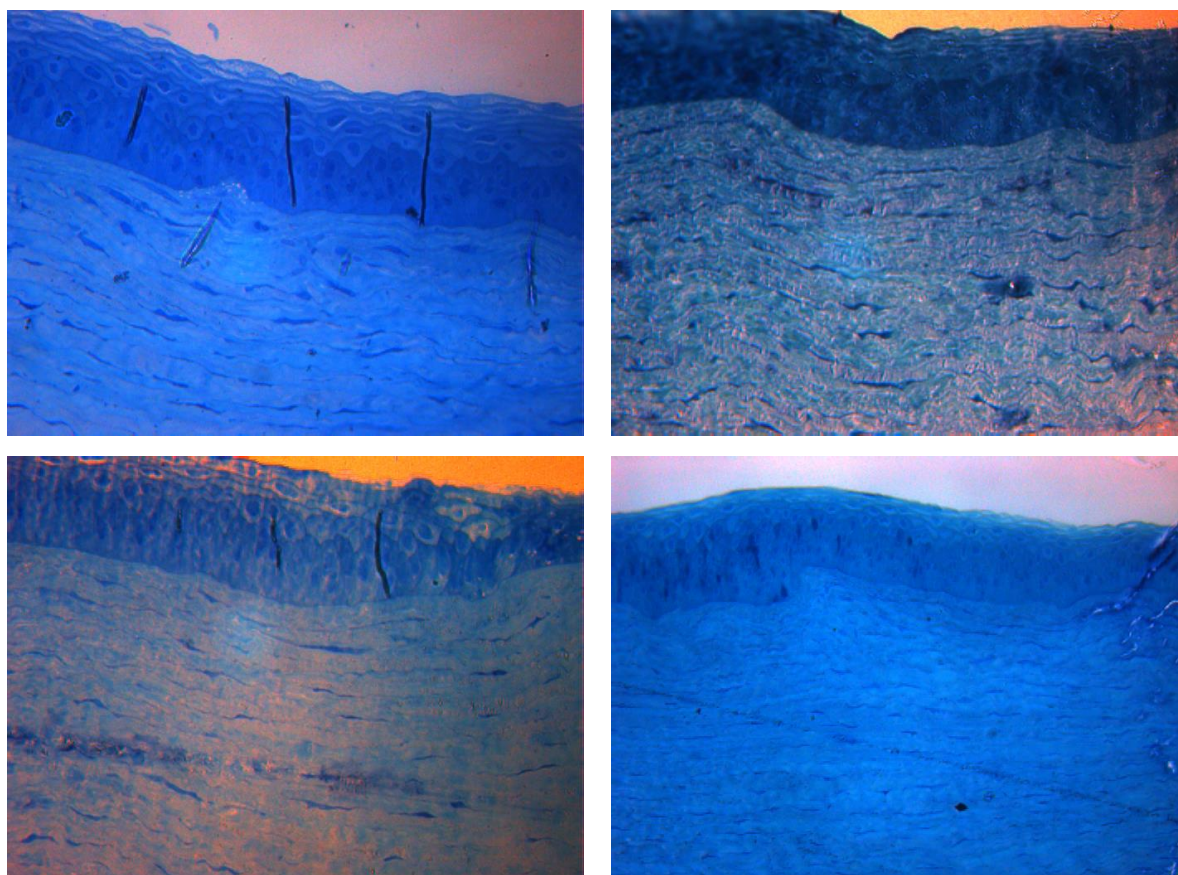
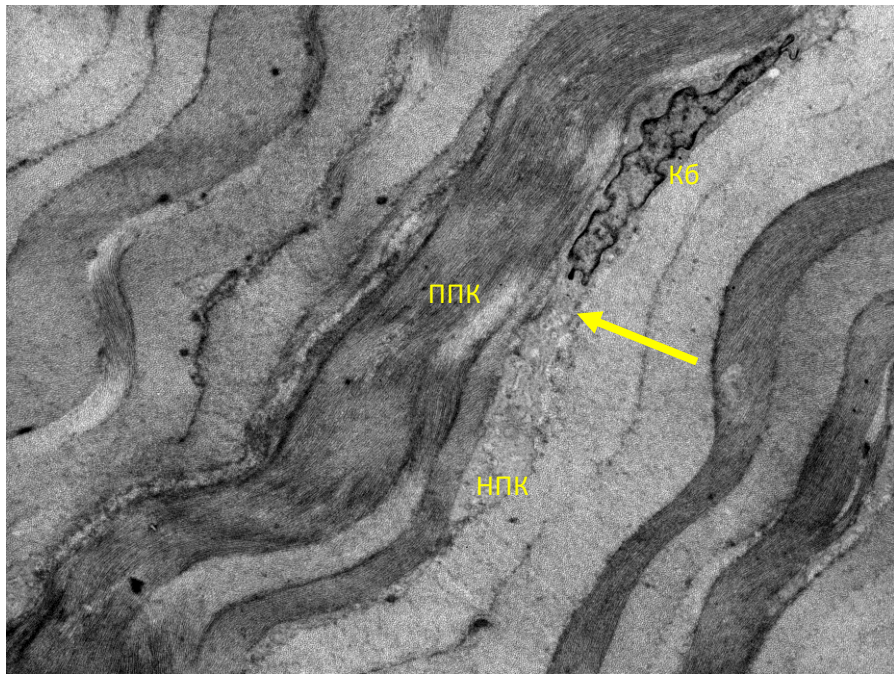


Рисунок 23 – Полутонкие срезы роговицы кроликов опытной группы 4.1 без насыщения рибофлавином. Окраска толуидиновым синим. Увеличение x400

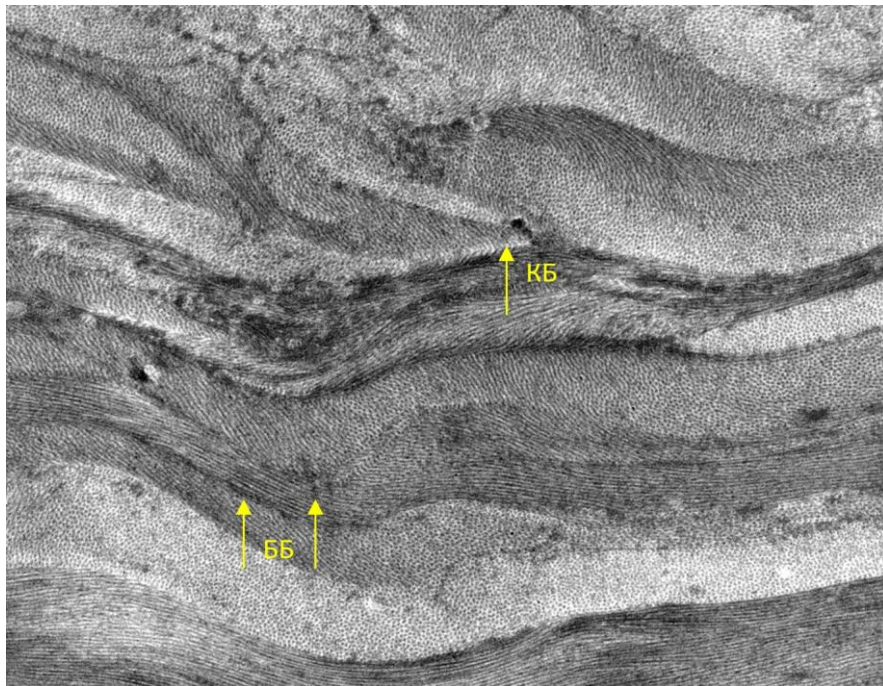
Строма представлена укладкой правильно ориентированных коллагеновых волокон без признаков отека, с умеренным количеством кератоцитов. Волнообразного хода стромальных волокон не обнаружено. Субэпителиальная фиброплазия отсутствует.

По данным световой микроскопии наблюдается полное восстановление структуры роговицы после лазерного воздействия.

По данным трансмиссионной электронной микроскопии, в опытной группе 4.1 (с насыщением стромы рибофлавином) в передних слоях стромы (прилежащих к зоне абляции) роговицы выявлено укрупнение волокон и пучков коллагена. На Рисунке 24А видно слияние (стрелка) новообразованного пучка коллагена (НПК) вблизи активно синтезирующего кератобласта (Кб) с предсуществующим пучком (ППК). На рисунке 24Б представлены два варианта слияния пучков: бок в бок (ББ) и конец в бок (КБ).



А



Б

Рисунок 24 – 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 – кератоцит; ББ – «бок в бок»; КБ – «конец в бок». Увеличение x4000

В группе 4.2 (без насыщения рибофлавином) в строме роговицы ход коллагеновых волокон не изменен, визуализируются параллельные пучки с равномерной толщиной и однородной структурой (Рисунок 25).

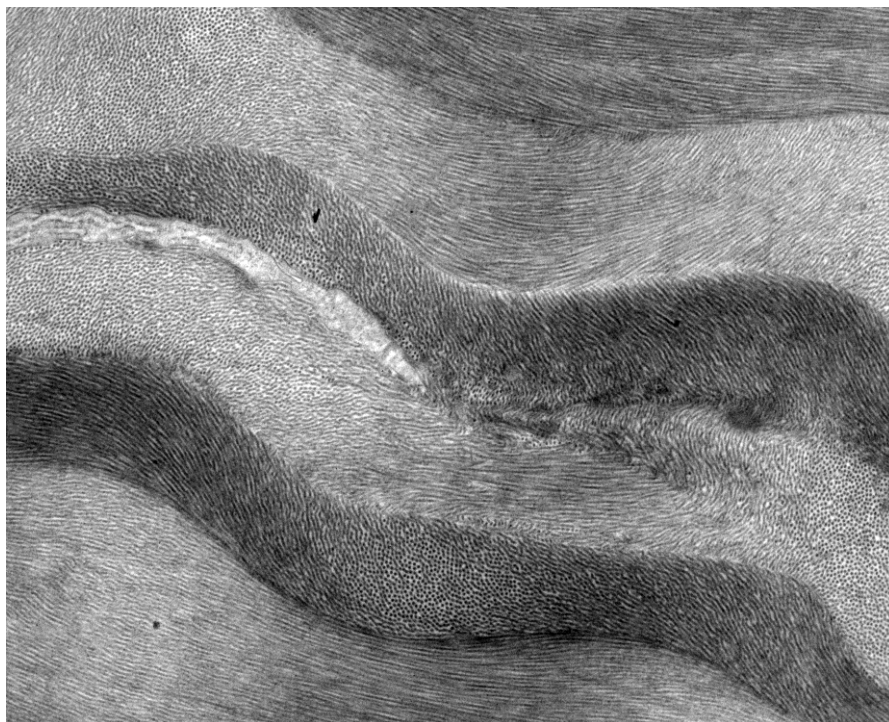


Рисунок 25 – Трансмиссионная электронная микроскопия роговицы кроликов опытной группы 4.2 без насыщения стромы рибофлавином. Продольный срез пучков коллагена. Увеличение $\times 4000$

На Рисунке 26А на поперечном срезе пучков коллагена определяется компактность упаковки волокон за счет увеличения поперечных сшивок (*стрелки*) в группе 4.1. В группе 4.2 поперечные сшивки не обнаружены (Рисунок 26Б). В сравнении расстояние между фибриллами в группе 4.1 меньше, чем в группе 4.2, концентрация на единицу площади – примерно в два раза больше.

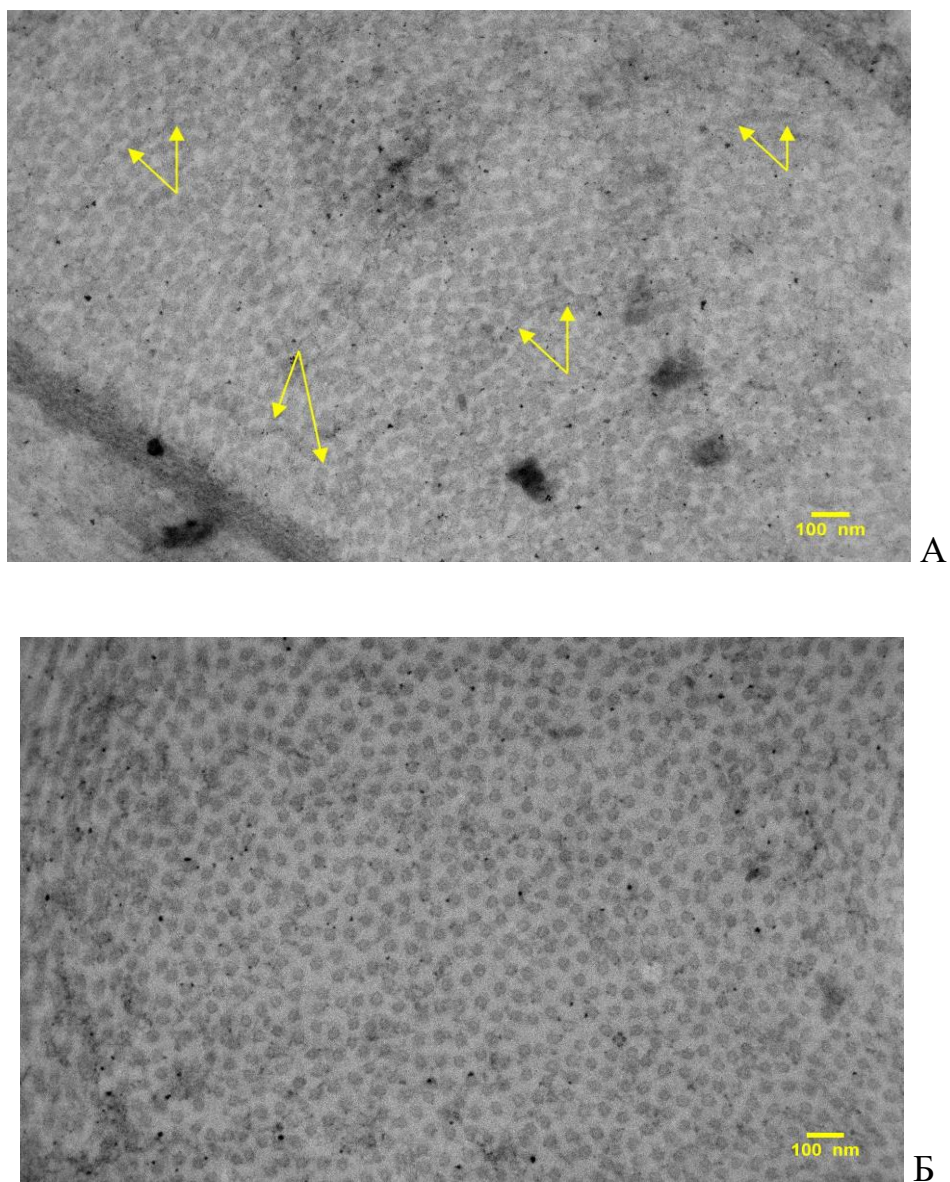


Рисунок 26 – Трансмиссионная электронная микроскопия роговицы кроликов опытной групп 4.1 с насыщением стромы рибофлавином (А) и 4.2 без насыщения стромы рибофлавином (Б). Поперечный срез пучков коллагена. Увеличение $\times 25000$

Таким образом, по результатам комплексной морфологической оценки установлено, что роговицы опытной группы 4.1 с насыщением стромы рибофлавином была подвержена изменениям, соответствующим кросслинкингу стромы с формированием стабильных поперечных сшивок коллагеновых волокон. В роговицах без насыщения стромы рибофлавином морфологически выявлено полное восстановление структуры после лазерного воздействия без признаков кросслинкинга стромы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эксимерлазерная коррекция аметропий является самым эффективным, безопасным и высокотехнологичным способом в современной кераторефракционной хирургии. В настоящее время методом выбора при эксимерлазерных вмешательствах является операция LASIK (лазерный in situ кератомилез), что обуславливается быстрым восстановлением зрительных функций и безболезненным периодом реабилитации за максимально короткие сроки в послеоперационном периоде. В современной рефракционной эксимерлазерной хирургии риск интраоперационных осложнений, благодаря новым совершенным моделям микрокератомов, сведен к минимуму. А современные высокоточные эксимерлазерные системы позволяют получить желаемый запланированный рефракционный эффект.

Однако очевидно, что формирование роговичного лоскута не только приводит к нарушению анатомической целостности роговицы и ее иннервации, но и индуцирует комплекс изменений, влияющих на ее биомеханические свойства [97, 133, 138, 154, 163].

Метод ФРК в настоящее время пользуется меньшей популярностью среди рефракционных хирургов и пациентов, из-за более длительного и болезненного послеоперационного периода, хотя является альтернативным при определенных анатомических особенностях роговицы [33, 46, 48, 95]. На сегодняшний день многие офтальмохирурги по всему миру пересмотрели свое отношение к этому методу кератофрефракционной хирургии и считают «безножевую» технику ФРК более щадящей, по сравнению с методом LASIK, в плане сохранения биомеханических функций и восстановления структурных изменений роговицы [155, 203].

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод о том, что большинство фоторефракционных операций на роговице сопровождаются ослаблением ее биомеханических свойств, что в ряде случаев может привести к возникновению индуцированной ятрогенной кератэктазии. До недавнего времени исследования в этом направлении практически не

освещались в мировой литературе, однако на сегодняшний день известна проблема возникновения такого осложнения у пациентов после проведения фоторефракционных операций. С таким осложнением в первую очередь столкнулись рефракционные хирурги при выполнении операции LASIK. При данном типе операции еще на стадии формирования роговичного лоскута возникает ослабление прочностных характеристик роговицы на 20-30%, и это ослабление только усиливается с увеличением объема абляции [122, 203, 202, 208].

Наиболее оптимальным способом лечения и предупреждения подобных осложнений до сих пор являлся кросслинкинг роговичного коллагена и различные методы его комбинирования с фоторефракционными операциями [105, 133, 154, 163, 211].

Несмотря на прогресс в данном направлении, комбинирование кросслинкинга роговицы с фоторефракционными операциями на ней до настоящего времени не получило широкого распространения в клинической практике. Это связано с целым рядом нежелательных побочных эффектов, обусловленных ультрафиолетовым облучением роговицы при кроссликинге, описанными ранее [15, 59, 167, 169, 193, 204].

Также стоит отметить, что процедура кросслинкинга коллагена роговицы по стандартному протоколу противопоказана к применению при значениях показателей кератопахиметрии менее 400 мкм. А, 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 (и его вариациями) кросслинкинга, а также его комбинациями с фоторефракционной абляцией [7, 11, 14, 75, 76, 87].

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, выявлению фотопротекторного эффекта и комплексным морфофункциональным исследованием посредством световой и трансмиссионной электронной микроскопии. Имеющиеся работы по изучению особенностей спектральной абсорбции рибофлавина, трансформированию 193 нм излучения эксимерного лазера при абляции роговицы и механизму кросслинкинга роговичного коллагена не снижают актуальности настоящего исследования [174, 178, 180, 224].

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

Для достижения поставленной цели решались следующие 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.

Предложенная методика фоторефракционной кератоабляции с фотопротекцией и эффектом кросслинкинга была разработана и смоделирована в экспериментах *ex vivo* и *in vivo*. В качестве материала экспериментальных исследований было использовано 90 глазах 90 кроликов породы Шиншилла массой от 2,5 до 3,5 кг.

Фоторефракционная абляция роговиц в экспериментах выполнялась на эксимерлазерной установке Wavelight-Allegretto 200 (США) в условиях отделения лазерной микрохирургии глаза ЦКДК «НМХЦ им. Н.И. Пирогова». Дозированная абляция стромы роговицы проводилась без и с предварительным 3-минутным аэрозольным насыщением 0,25% изотоническим раствором рибофлавина. Данный тип насыщения стромы роговицы фотосенсибилизатором включает в себя ряд преимуществ перед обычным капельным способом, который применяется в современной технологии классического и ускоренного кросслинкинга. Анализ кривых капельного насыщения роговицы показал, что уже через 3-5 минут рибофлавин накапливается в достаточной концентрации на глубине 200-300 мкм [144, 175, 182, 205]. А поскольку временной интервал абляции, как правило, не превышает 1 минуты, то нет необходимости в применении декстрана для поддержания концентрации на необходимом уровне. Аэрозольное орошение 0,25% изотоническим раствором рибофлавина с помощью ультразвукового небулайзера позволило интенсифицировать насыщение стромы, что связано с высокой дисперсностью аэрозольных частиц и способствует их более быстрому и глубокому проникновению в строму роговицы. Кроме того, при такой технологии исключалось образование неравномерного слоя раствора рибофлавина на поверхности

стромы перед проведением её фоторефракционной абляции, что могло стать причиной остаточной аметропии с эффектами гипер- или гипокоррекции.

Оценка разницы клинического течения производилась в эксперименте *in vivo* на 32 глазах 32 кроликов. Животные были разделены на две группы: группа 1.1 – 16 глаз 16 животных, на которых была выполнена трансэпителиальная ФРК без и с предварительным насыщением стромы роговицы изотоническим 0,25% раствором рибофлавина на глубину 100 мкм; группа 1.2 – 16 глаза 16 животных, которым была выполнена трансэпителиальная ФРК без (подгруппа 1.1А, 8 глаз) и с предварительным насыщением (подгруппа 1.1.Б, 8 глаз) стромы роговицы изотоническим 0,25% раствором рибофлавина на глубину 50 мкм. Контрольные осмотры осуществлялись на 1-е, 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки после эксперимента и осуществлялись 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 животных проводилась по балльной системе. Максимально возможный балл оценки составлял 27 баллов, минимально возможный – 0 баллов. Оценивались следующие критерии: слезотечение, светобоязнь, эпителизация, состояние эпителия и отечность стромы.

На протяжении всего периода наблюдений, в обеих группах выявлена клиническая разница в выраженности воспалительных и регенераторных процессов. Так, на глазах после абляции с рибофлавином все вышеперечисленные негативные реакции проходили заметно менее выражено, о чем свидетельствуют среднебалльные оценки экспериментальных животных из обеих групп. 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 проведенном 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.

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

фотопротекторных свойствах рибофлавина, которые подтверждаются данными литературы [39, 46, 57, 65].

Для оценки упруго-прочностных свойств образцов роговиц кроликов при эксимерлазерной абляции без и с предварительным насыщением стромы раствором рибофлавина в экспериментах *ex vivo* и *in vivo* были исследованы образцы роговиц 42 глаз кроликов. В экспериментах *ex vivo* (32 глаза 16 кроликов) глаза были также разделены на две группы: группа 2.1 – контрольная (нативные образцы роговиц); группа 2.2 – исследуемая, где абляция выполнялась на глубину 100 мкм в режиме ФТК; группа 2.3 в экспериментах *in vivo* (10 глаз 10 кроликов) – трансФРК с глубиной абляции 50 мкм соответственно. Тензиометрические испытания проводились на установке Zwick/Roell BZ 2.5 /TN1S (Германия). Исследования проводились на базе лаборатории химии и технологии материалов для сердечно-сосудистой хирургии в ФГБНУ «НЦССХ им. А.Н. Бакулева» (Москва).

При оценке биомеханических свойств аблированных образцов роговиц глаз экспериментальных животных, предварительно насыщенных рибофлавином, было отмечено повышение их упруго-прочностных свойств по сравнению с аналогичными образцами, на которых абляция проводилась без насыщения рибофлавином. Оценивались такие свойства, как прочность при растяжении, сила на разрыв и модуль упругости (модуль Юнга).

На примере экспериментов *ex vivo*, было выявлено статистически значимое увеличение прочности при растяжении – $7,2 \pm 1,6$ мПа у образцов, аблированных на глубину 100 мкм с предварительным насыщением стромы раствором рибофлавина, против $5,1 \pm 1,4$ мПа у образцов, аблированных на глубину 100 мкм без предварительного насыщения стромы раствором рибофлавина ($p=0,0011$). При оценке результатов эксперимента *in 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*: $0,9 \pm 0,4$ Н/мм² у образцов, аблированных с рибофлавином против $0,5 \pm 0,2$ Н/мм² у образцов после абляции без предварительного насыщения стромы рибофлавином ($p=0,016$); и ее отсутствие в экспериментах *in vivo*: $1,0 \pm 0,3$ Н/мм² у образцов, аблированных с рибофлавином и $0,9 \pm 0,2$ Н/мм² у образцов после абляции без рибофлавина ($p=0,7$). При этом, показатель модуля упругости в контрольной группе составил $0,9 \pm 0,5$ Н/мм².

Как показали экспериментальные исследования, абляция стромы роговицы глаз кролика на глубину 100 мкм является избыточной для данного вида животного (в нашем случае, кролик породы шиншилла). В результате чего возникает ярко выраженная асептическая воспалительно-регенераторная реакция, в ходе которой происходят необратимые морфофункциональные изменения в глубжележащих слоях роговицы. Однако данные исследования позволили выявить значительное повышение упруго-прочностных свойств

образцов роговиц после проведения абляции на глубину 100 мкм. Вышеизложенное позволяет сделать вывод о том, что абляция пропитанной раствором рибофлавина роговицы кролика на указанную глубину приводит к возникновению изменений в глубжележащих слоях стромы, схожих с теми, которые образуются после проведения процедуры кросслинкинга по «классической» методике [108, 177, 233, 258, 261]. В то же время вопрос о целесообразности столь значительного увеличения упруго-прочностных свойств роговицы остается открытым. Как известно, модуль упругости (модуль Юнга) является основным критерием определения тензиометрических характеристик роговицы при стандартной технологии кросслинкинга [258, 261]. И при «классической» методике кросслинкинга, увеличение модуля упругости (модуль Юнга) может достигать 200-300%, включая при этом все негативные аспекты процедуры в целом [169, 193, 204]. Результаты экспериментов *in vivo* показали достижение исходных (в случае максимальной силы при разрыве), либо слегка превосходящих исходные (в случае прочности при растяжении), прочностных свойств, при этом упругость («жесткость») роговицы (модуль Юнга) остается на исходном, либо близко к исходному, уровне.

Таким образом, разработанная технология, избавляет роговицу от нежелательной УФ-нагрузки, в случае необходимости проведения процедуры кросслинкинга по стандартному, либо ускоренному протоколу с целью предотвращения развития осложнений в послеоперационном периоде, что нивелирует тот ущерб, который обычно наносится роговице на клеточном и функциональном уровне во время процедуры кросслинкинга [165, 212], а наличие достоверного увеличения максимальной силы при разрыве и прочности при растяжении, а также отсутствие достоверной разницы в показателях модуля упругости (модуля Юнга) в экспериментах *in vivo* указывает на физиологичность предложенной технологии лазер-индуцированного кросслинкинга.

Для определения влияния насыщения стромы раствором рибофлавина на скорость и точность абляции до и после ее проведения в экспериментах *ex vivo* была выполнена ультразвуковая кератопахиметрия, а также оптическая когерентная томография роговицы – группы 2.2 и 2.3 (32 глаза 32 кроликов). Средняя толщина роговиц до абляции составила 472 ± 24 мкм; после дозированной абляции на глубину 100 мкм и без предварительного насыщения стромы раствором рибофлавина – 382 ± 28 мкм; после дозированной абляции на глубину 100 мкм с предварительным насыщением стромы роговицы раствором рибофлавина – 373 ± 29 мкм. Таким образом, влияния раствора рибофлавина на скорость и точность абляции выявлено не было ($p > 0,05$).

Для оценки морфологических изменений после лазериндуцированного кросслинкинга при эксимерлазерной абляции с рибофлавином объектом исследования служили препараты роговиц глаз 12 кроликов, прижизненно подвергнутые эксимерлазерной абляции на глубину 50 мкм без и с предварительным насыщением стромы изотоническим 0,25% раствором рибофлавина группы 3.1 и 3.2 (12 кроликов, 12 глаз). Патоморфологическое исследование проводилось по истечению 1, 3 и 7 суток.

Сравнение образцов роговиц после трансФРК без и с предварительным насыщением стромы рибофлавином привело к следующим результатам: абляция в обоих вариантах проведена эффективно, на одинаковую глубину. Воспалительная инфильтрация сильнее выражена на глазах после абляции с рибофлавином. Однако признаки воспаления при этом дольше персистируют на глазах после абляции без рибофлавина. Аналогично в обоих вариантах наблюдается незначительно утолщение роговицы за счет отека наружных слоев стромы роговицы, который спадал к 3-му дню. Эпителизация роговицы эффективнее и активнее протекает на глазах после трансФРК с рибофлавином. Во всех образцах происходит активация кератоцитов и изменения в неклеточной части стромы в проекции абляции, при этом качество коллагеновых волокон разное: в случаях после трансФРК без

рибофлавина волокна более регулярные, тогда как на глазах после трансФРК 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, которое довольно подробно описано и в литературе [188, 233, 262, 266].

В свою очередь, 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 изменения, свойственные кросслинкингу (такие как: укрупнение волокон и пучков коллагена; образование новообразованных пучков коллагена; увеличение компактности упаковки волокон за счет количества поперечных сшивок), что также подтверждается данными литературы [258, 266]. 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 кросслинкингу.

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

1. Аветисов С.Е., Бубнова И.А., Новиков И.А. и др. Новый принцип в исследовании биомеханических свойств роговицы (предварительное сообщение) // Вестн. офтальмологии. – 2008. – Т. 124. – № 5. – С. 25-29.
2. Аветисов С.Э., Егорова Г.Б., Фёдоров А.А., Бобровских И.В. Конфокальная микроскопия роговицы при кератоконусе // Вестн. офтальмологии. – 2008. – № 3. – С. 6-10.
3. Аветисов С.Э., Бубнов И.А. Исследование биомеханических свойств роговицы *in vivo* // Биомеханика глаза: Сб. тр. конф. – М., 2007. – С. 76-80.
4. Аветисов С.Э., Воронин Г.В. Экспериментальное исследование механических характеристик роговицы после эксимерлазерной фотоабляции // Клин. офтальмология. – 2001. – № 3. – С. 83-86.
5. Аветисов С.Э., Мамиконян В.Р. Кераторефракционная хирургия. – М.: Полигран, 1993. – 120 с.
6. Аветисов С.Э., Федоров А.А., Введенский А.С., Ненюков А.К. Экспериментальное исследование влияния радиальной кератотомии на механические свойства роговицы // Офтальмол. журн. – 1990. – № 1. – С. 54-58.
7. Альхамви А., Новиков С.А., Соколов В.О. и др. О расширении показаний к применению коллагенового кросслинкинга при заболеваниях роговицы // Офтальмол. ведомости. – 2012. – № 5(4). – С. 4-11.
8. Анисимов С.И., Анисимова С.Ю. Персонализированный (локальный) УФ-кросслинкинг в лечении кератокануса и эктазий роговицы // Офтальмология. – 2017. – Т. 15. – № 3. – С. 195-199.
9. Анисимов С.И., Трубилин В.Н., Золоторевский К.А. Результаты проведения персонализированного кросслинкинга для лечения кератэктазий // Восток-Запад: Научно-практ. конф. по офтальмологии с международным участием: Сб. науч. тр. – Уфа, 2011. – С. 57.

10. Балашевич Л.И. Рефракционная хирургия. – Спб., 2002. – 285 с.
11. Бикбов М.М., Бикбова Г.М. Результаты лечения кератоконуса методом имплантации интрастромальных роговичных колец MyoRing в сочетании с кросслинкингом роговичного коллагена // Офтальмохирургия. – 2012. – № 4. – С. 6-9.
12. Бикбов М.М., Бикбова Г.М. Эктазии роговицы (патогенез, патоморфология, клиника, диагностика, лечение) / ГУ «Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней» АН РБ. – М.: Офтальмология, 2011. – 168 с.
13. Бикбов М.М., Бикбова Г.М., Хабибуллин А.Ф. Кросслинкинг роговичного коллагена в лечении кератоконуса // Вестн. офтальмологии. – 2011. – № 5. – С. 21-25.
14. Бикбов М.М., Бикбова Г.М., Хабибуллин А.Ф. Применение кросслинкинга роговичного коллагена в лечении буллезной кератопатии // Офтальмохирургия. – 2011. – № 1. – С.33-34.
15. Бикбова Г.М. Гистоморфология роговицы после кросслинкинга по поводу кератоконуса // Восток-Запад: Междунар. научно-практ. конф.: Материалы. – Уфа, 2010. – С. 71-74.
16. Битюрин Н.М. Объёмная модель термической лазерной абляции полимеров // Известия Рос. Академии Наук. Сер. Физ. – 2001. – № 65(4). – С. 532-535.
17. Борискина Л.Н., Солодкова Е.Г., Мелихова И.А. Система объективной оценки гистоморфологических изменений роговицы после хирургического лечения // Рефракция-2014: Сб. науч. работ. – Самара, 2014. – С. 117-121.
18. Бубнова И.А., Кузнецов А.В., Зелянина Е.В. Исследование эффективности процедуры «перекрестной сшивки» коллагена роговицы у пациентов с прогрессирующим кератоконусом в отдаленные сроки наблюдения // Вестн. офтальмологии. – 2015. – Т. 131. – № 5. – С. 38-42.

19. Воллензак Г., Иомдина Е.Н. Влияние удаления роговичного эпителия на биомеханические и морфологические изменения роговицы после ее обработки методом кросс-линкинга // Биомеханика глаза-2009: Сб. тр. конф. – М., 2009. – С. 102-110.

20. Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов: Учеб. пособие для мед. и биол. спец. вузов. – М.: Высш. шк., 1989. – 199 с: ил.

21. Гиллем А., Штерн Е. Электронные спектры поглощения органических соединений. – М.: Иностранная литература, 1957. – 386 с.

22. Дога А.В., Качалина Г.Ф., Кишкин Ю.И. и др. Фемтосекундный лазер – новые возможности в рефракционной хирургии // Федоровские чтения-2009: Сб. науч. ст. – М., 2009. – С. 162-163.

23. Дога А.В., Майчук Н.В., Кондакова О.И Клинико-диагностический алгоритм оценки состояния глазной поверхности у пациентов с длительным ношением контактных линз // Офтальмология.– 2011. – Т. 8. – № 1. – С. 15-19.

24. Егорова Г.Б., Бобровских И.В., Савочкина О.А. Возможности компенсации оптических аберраций при кератоконусе с помощью жестких газопроницаемых контактных линз // Вестн. офтальмологии. – 2010. – № 4. – С. 25-30.

25. Егорова Г.Б., Фёдоров А.А., Бобровских И.В. Диагностическое значение конфокальной микроскопии роговицы при кератоконусе и осложнениях контактной коррекции зрения // Новейшие достижения в лечении и диагностике глазных заболеваний: Тез. докл. конф. – М., 2007. – С. 29-31.

26. Егорова Г.Б., Бородина Н.В., Бубнова И.А. Аберрации человеческого глаза, способы их измерения и коррекции (обзор литературы) // Рус. Мед. Журн. – 2003. – Т. 4. – № 4. – С. 24-27.

27. Зотов В.В. Циркулярный тоннельный кросслинкинг роговичного коллагена с применением фемтопультного лазера в лечении пациентов с прогрессирующим кератоконусом: Дисс. ... канд. мед. наук. – М., 2016.

28. Зотов В.В., Паштаев Н.П. Новый метод кросслинкинга роговичного коллагена в лечении больных с кератоконусом. Отдаленные результаты // Современные технологии катарактальной и рефракционной хирургии: Сб. науч. ст. – М., 2011. – С. 299-302.

29. Измайлова С.Б. Медико-технологическая система хирургического лечения прогрессирующих кератэктазий различного генеза: Дисс. ... д-ра мед. наук. – М., 2014.

30. Иомдина Е.Н., Тарутта Е.П., Игнатьева Н.Ю. и др. Фундаментальные исследования биохимических и ультраструктурных механизмов патогенеза прогрессирующей миопии // Рос. офтальмол. журн. – 2008. – Т. 1. – № 3. – С. 7-12.

31. Каспаров А.А., Каспарова Е.А. Принципы эксимерлазерного и хирургического лечения кератоконуса // Рефракционная хирургия и офтальмология. – 2002. – № 2. – С. 34-36.

32. Каспарова Е.А. Патогенетически обоснованное лечение начального кератоконуса комбинированным методом эксимерлазерной хирургии (комбинация фоторефракционной и фототерапевтической кератэктомии) // Вестн. офтальмологии. – 2002. – № 5. – С. 21 - 24.

33. Каспарова Е.А. Патогенетический метод лечения начального кератоконуса – комбинация фоторефракционной и фототерапевтической кератэктомии (ФРК+ФТК) // Актуальные проблемы офтальмологии: Юбилейн. симпозиум НИИ ГБ РАМН: Тез. докл. – М., 2003. – С. 42-43.

34. Мошетьова Л.К., Чернакова Г.М., Ярлыкова И.В. Применение препаратов Флоксан и Корнерегель у пациентов с механическими и инфекционными осложнениями контактной коррекции // Клин. офтальмология. – 2002. – Т. 3. – № 1. – С. 26-28.

35. Корниловский И.М., Ражев А.М. Кератомоделирование низкоинтенсивным УФ излучением эксимерных лазеров // Лазеры и медицина: Тез. междунар. конф. – М., 1989. – Ч. 1. – С. 29.
36. Корниловский И.М. Лазериндуцированное рефракционное кератомоделирование в эксперименте. Всеросс. съезда офтальмологов, 6-й: Тез. докл. – М., 1994. – С. 106.
37. Корниловский И.М. Механизм лазериндуцированного рефракционного кератомоделирования и его новые возможности при применении излучения фемтосекундного лазера // Рефракционная хирургия и офтальмология. – 2009. – Т. 9. – № 2. – С. 4-13.
38. Корниловский И.М. Новые неинвазивные технологии лазерной модификации оптико-рефракционных структур глаза // Рефракционная хирургия и офтальмология. – 2009. – Т. 9. – № 3. – С. 17-26.
39. Корниловский И.М. Новые подходы к эксимерлазерной хирургии роговицы на основе фотопротекции и фотополимеризации // Восток-Запад: Научно-практ. конф. по офтальмохирургии с международным участием: Сб. научн. тр. – Уфа, 2013. – С. 89-92.
40. Корниловский И.М. Особенности технологии и клиники субэпителиальной фоторефрактивной кератэктомии // Рефракционная хирургия и офтальмология. – 2001. – №1 (2). – С. 20-25.
41. Корниловский И.М. Эксимерлазерная микрохирургия при патологии роговицы: Дисс. ... д-ра мед. наук. – М., 1995. – 370 с.
42. Корниловский И.М. Лазер-индуцированный кросслинкинг в модификации абляционной поверхности при фоторефракционной кератэктомии // Катарактальная и рефракционная хирургия. – 2016. – Т. 16. – № 4. – С. 29-35.
43. Корниловский И.М., Ражев А.М., Китай С.М., Семчишин В.А. Кератомоделирование низкоинтенсивным лазерным излучением эксимерных лазеров // Изв. АН СССР. Сер. физ. – 1990. – Т. 54, № 6. – С. 1594-1596.

44. Корниловский И.М. Механизм кератомоделирования низкоинтенсивным ультрафиолетовым излучением эксимерных лазеров // Научно-практ. конф. офтальмологов Абхазской АССР посвящ. 75-летию со дня рожд. д-ра мед. наук С. Я. Миминошвили: Тез. докл. - Сухуми, 1990. -С. 15 – 17.

45. Корниловский И.М., Семенов А.Д. Новые подходы к коррекции аномалий рефракции на основе лазериндуцированного кератомоделирования // Всеросс. съезд офтальмологов, 7-й: Тез. докл. – М., 1999. – С. 254.

46. Корниловский И.М., Султанова А.И. Новые этапы развития технологии трансэпителиальной ФРК и её оптимизации на основе фотопротекции // Катарактальная и рефракционная хирургия. – 2013. – Т. 13. – № 3. – С. 15-19.

47. Корниловский И.М., Султанова А.И. Патогенетическая направленность фотопротекции в эксимерлазерной рефракционной хирургии роговицы // Akademik Zerifa Aliyevanin 90 ilik yubileyina hasr olunmus «Ophthalmologiyenin actual problemleri» Beynalexalq elmi konfrasm materiallari. – Baki: Nafta-Press, 2013. – С. 120-122.

48. Корниловский И.М., Султанова А.И., Сафарова А.Н., Миришова М.Ф. Патогенез субэпителиальной фиброплазии после ФРК и новые подходы к её профилактике на основе фотопротекции // Современные технологии катарактальной и рефракционной хирургии. – М., 2013. – С. 259-263.

49. Корнюшина Т.А., Розенблюм Ю.З. Аберрации оптической системы глаза человека и их клиническое значение // Вестн. оптометрии. – 2002. – № 3. – С. 13-20.

50. Костюченкова Н.В. Аберрации оптической системы глаза при различных методах коррекции астигматизма у детей и подростков: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – М., 2008. – 26 с.

51. Краснов М.М., Каспарова Е.А., Каспаров А.А., Шамшинова А.М. Функциональные результаты эксимерлазерной хирургии раннего

кератоконуса // Офтальмология на рубеже веков: Тез. докл. конф. – СПб., 2001. – С. 48-49.

52. Кузнецов А.И. Лазерная модификация гелей и гибридных материалов на основе оксида титана: Дисс. ... канд. физ.-мат. наук. – Н. Новгород, 2006. – 199 с.

53. Куренков В.В. Руководство по эксимерлазерной хирургии роговицы. – М., 2002. – 398 с.

54. Ленинджер А. Основы биохимии / Пер. с англ. – Т. 1. – М., 1985. – С. 176-179.

55. Мазуров В.И. Биохимия коллагеновых белков. – М.: Медицина, 1974.

56. Малышев А.Ю., Битюрин Н.М. Модель лазерного свеллинга полимеров при воздействии наносекундных импульсов // Квант. Электроника. – 2005. – № 35(9). – С. 825-830.

57. Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., Мороз З.И. и др. Экспериментальное изучение ферментативной устойчивости донорской роговицы, обработанной по методике УФ-кросслинкинга // Офтальмохирургия. – 2012. – № 1. – С.20-23.

58. Малюгин Б.Э., Измайлова С.Б., Авраменко С.А., Мерзлов Д.Е. Лечение парацентральных кератэктазий различного генеза методом интрастромальной кератопластики с имплантацией роговичного сегмента в зону наибольшей эктазии // Офтальмохирургия. – 2011. – № 4. – С. 16-22.

59. Малюгин Б.Э., Измайлова С.Б., Мерзлов Д.Е. и др. Отдаленные результаты использования различных технологий УФ-кросслинкинга у пациентов с прогрессирующим кератоконусом // Офтальмохирургия. – 2014. – № 4. – С. 42-49.

60. Малюгин Б.Э., Измайлова С.Б., Шацких А.В. и др. Экспериментальное обоснование эффективности различных методов доставки рибофлавина в строму роговицы как начального этапа выполнения УФ-кросслинкинга // Офтальмохирургия. – 2014. – № 1. – С.25–29.

61. Маслова Н.А. Формирование интрастромальных роговичных тоннелей для имплантации роговичных сегментов у пациентов с кератоконусом с помощью фемтосекундного лазера IntraLase // Бюллетень СО РАМН. – 2009. – № 4. – С. 75-79.

62. Мещерякова Г.П., Виноградов Б.А., Перепелкин К.Е. Действие лазерного излучения на полимерные материалы // Научные основы и прикладные задачи. В 2 книгах. – Книга 2. Полимерные материалы. Практическое применение лазерных методов в изучении и обработке. – С-Пб.: Наука, 2006. – 443 с.

63. Милова С.В. Хирургическое лечение миопии и астигматизма у пациента с кератоконусом // Современные технологии катарактальной и рефракционной хирургии. – М., 2012. – 249 с.

64. Мороз З.И., Измайлова С.Б., Легких С.Л. и др. Интрастромальная кератопластика с имплантацией сегментов в сочетании с кросслинкингом роговичного коллагена // Офтальмохирургия. – 2013. – № 3. – С. 17-22.

65. Нероев В.В., Петухова А.Б., Гундорова Р.А. и др. Влияние кросслинкинга на заживление экспериментальных хирургических ранений роговицы // Федоровские чтения-2012. Всерос. конф. с международ. участием, 10-я: Сб. научн. работ. – М., 2012. – С. 145.

66. Нероев В. В., Петухова А. Б., Гундорова Р. А. и др. Кросслинкинг после передней послойной кератопластики // Офтальмол. ведомости. – 2012. – № 5(3). – С. 56-60.

67. Нероев В.В., Петухова А.Б., Данилова Д.Ю. и др. Кросс-линкинг роговичного коллагена в лечении трофических и бактериальных язв роговицы // Рос. мед. журн. – 2013. – № 2. – С. 25-27.

68. Никитин В.Н., Перский Е.Э., Утевская Л.А. Возрастная и эволюционная биохимия коллагеновых структур.– Киев: Наукова думка, 1977.

69. Новиков С.А., Кольцов А.А., Рейтузов В.А. Лечебные мягкие контактные линзы: классификация, показания к применению и перспективы // Современная оптометрия. – 2013. – № 3. – С. 9-15

70. Оудиан Дж. Основы химии полимеров / Пер. с англ. – М.: Мир, 1974. – 614 с.

71. Паштаев Н.П., Зотов В.В. Сравнительный анализ отдаленных результатов стандартного и локального фемтокреслинкинга у больных с прогрессирующим кератоконусом // Вестник ОГУ. – 2014. – № 12. – С. 173.

72. Паштаев Н.П., Зотов В.В., Ларионов Е.В. и др. Электронная микроскопия роговичной стромы после стандартного креслинкинга и с применением фемтолазера в эксперименте // Офтальмохирургия. – 2015. – № 2. – С. 22-27.

73. Паштаев Н.П., Зотов В.В. Новый метод креслинкинга роговичного коллагена в лечении больных с кератоконусом. Предварительные результаты // Федоровские чтения-2011: Всерос. науч. конф. с междунар. участием, 9-я: Сб. науч. работ. – М., 2011. – С. 84.

74. Пенкина А.В. Комбинированное лечение кератоконуса: фемтолазерная имплантация интрастромальных роговичных сегментов в сочетании с креслинкингом роговичного коллагена: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2012. – 20 с.

75. Пузикова О.А. Применение метода роговичный креслинкинг в лечении эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы // Итог. науч. конф. молодых ученых Ростовского государственного медицинского университета, 66-я: Материалы конф. – Ростов-на-Дону, 2012. – С. 329.

76. Пузикова О.А. Результаты применения метода роговичный креслинкинг в лечении эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы после оперативных вмешательств по поводу катаракты // Восток-Запад-2012: Научно-практ. конф. по офтальмохирургии с междунар. участием: Тез. докл. – Уфа, 2012. – С. 116-117.

77. Ражев А.М. Исследование воздействия излучения 193 нм и 223 нм эксимерных лазеров на роговицу глаза человека в рефракционной хирургии // Оптический журнал. – 2009 – Т. 76. – № 5. – С. 20-23.

78. Ражев А.М., Черных В.В., Ермакова О.В. и др. Воздействие ультрафиолетового излучения эксимерных лазеров на склеральную ткань глаза человека в эксперименте // Офтальмохирургия. – 2013. - № 4. – С.98-103.

79. Розенблюм Ю.З. Оптометрия. – М., 1996. – 168 с.

80. Румянцева О.А. Клинико-биологические аспекты регенерации роговицы после фоторефракционной кератэктомии: Дисс. ... д-ра мед. наук. – М., 2003. – 316 с.

81. Семчишен В., Мрохен М., Сайлер Т. Оптические aberrации человеческого глаза и их коррекция // Рефракционная хирургия и офтальмология. – 2003. – Т. 3. – № 1. – С. 5-13.

82. Слонимский Ю.Б., Слонимский А.Ю. К вопросу о показаниях для рефракционной сквозной пересадки роговицы // Актуальные проблемы офтальмологии: Сб. науч. тр. – Уфа, 1996. – С. 43-46.

83. Слонимский Ю.Б. Кератоконус. Рефракционная микрохирургия и некоторые аспекты реабилитации больных: Дисс. ... д-ра мед. наук. – М., 1994.

84. Солодкова Е.Г., Борискина Л.Н., Ремесников И.А. Сравнительный анализ способов лечения кератоконуса // Актуальные проблемы офтальмологии: Всерос. науч. конф. молодых ученых, 6-я: Сб. науч. работ. – М., 2011. – С. 229-231.

85. Солодкова Е.Г., Ремесников И.А. Анализ отдаленных результатов кросслинкинга роговичного коллагена при лечении прогрессирующего кератоконуса // Практическая медицина. – 2012. – Т. 1. – С. 118-120.

86. Тарутта Е.П. Возможности профилактики прогрессирующей и осложненной миопии в свете современных знаний о ее патогенезе // Вестн. офтальмологии. – 2006. – № 1. – С. 43-47.

87. Трубилин В.И., Пузикова О.А., Анисимов С.И. Применение локального роговичного кроссликинга в лечении эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы // Катарактальная и рефракционная хирургия. – 2012. – № 2. – С. 40-44.

88. Фейнбаум К. Современные аспекты этиопатогенеза и лечения кератоконуса // Офтальмохирургия. – 2011. – № 3. – С. 80-83.

89. Шелудченко В.М. Зрительное разрешение после рефракционных операций с применением кератомилеза и фотоабляции // Глаз. – 2005. – Т. 35. – № 1. – С. 2-7.

90. Шелудченко В.М. Разрешающая способность глаза после рефракционных операций: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., 1995. – 39 с.

91. Шелудченко В.М., Куренкова Н.В. Закономерности адаптации лоскута роговицы при лазерном кератомилезе. Осложнения и их профилактика // Съезд офтальмологов России, 7-й: Тез. докл. – М., 2000. – С. 306-307.

92. Шляпинтох В.Я. Фотохимические превращения и стабилизация полимеров. – М.: Химия, 1979. – 344 с.

93. Эмануэль Н.М., Бучаченко А.Л. Химическая физика старения и стабилизации полимеров. – М.: Наука, 1982. – 360 с.

94. Эскина Э.Н. Современные подходы к коррекции пресбиопии // Актуальные вопросы офтальмологии: Научно-практ. конф., 6-я: Сб. материалов. – М., 2014. – С. 102-108.

95. Эскина Э.Н., Паршина В.А., Степанова М.А. Результаты коррекции миопии высокой степени методом трансэпителиальной ФРК на установке SCHWIND AMARIS // Современные технологии в офтальмологии. – 2014. – № 3. – С. 239.

96. Эскина Э.Н. Оценка и прогнозирование результатов фоторефракционной кератэктомии: Автореф. дисс. ... д-ра мед наук. – М., 2002. – 45 с.

97. Abahussin M., Hayes S., Edelhauser H. et al. A microscopy study of the structural features of Ppost-LASIK human corneas // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – No. 5. – e63268: Pub. online 2013 May 1. doi: 10.1371/journal.pone.0063268.
98. Alex Lap Ki Ng, Tommy CYF Chan, CK Cheng. Conventional versus accelerated corneal collagen cross-linking in the treatment of keratoconus// *Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2016. – Vol. 44. – Issue 1. – P. 8-14.
99. Angunawela R.I., Arnalich-Montiel F., Allan B.D.S. Peripheral sterile corneal infiltrates and melting after collagen crosslinking for keratoconus // *J. Cataract Refract. Surg.* – 2009. – Vol. 35. – No. 3. – P. 606-607.
100. Arboleda A., Kowalczyk L., Savoldelli M. et al. Evaluating in vivo delivery of riboflavin with Coulomb-controlled iontophoresis for corneal collagen cross-linking: a pilot study // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2014. – Vol. 55. – No. 4. – P. 2731-2738.
101. Artal P. Understanding aberrations by using double-pass techniques // *J. Refract. Surg.* – 2000. – Vol. 16. – No. 5. – P. 560-562.
102. Aslanides I.M., Dessi C., Georgoudis P. et al. Assessment of UVA-Riboflavin corneal cross-linking using small amplitude oscillatory shear measurements // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2016. – Vol. 57. – P. 2240-2245.
103. Bagga B., Pahuja S., Murthy S., Sangwan V.S. Endothelial failure after collagen cross-linking with riboflavin and UV-A: case report with literature review // *Cornea.* – 2012. – Vol. 31. – No. 10. – P. 1197-1200.
104. Baiocchi S., Mazzotta C., Cerretani D., Caporossi T. Corneal crosslinking: riboflavin concentration in corneal stroma exposed with and without epithelium // *J. Cataract Refract. Surg.* – 2009. – Vol. 35. – No. 5. – P. 893-899.
105. Behndig A. Corneal collagen crosslinking for ectasia after refractive surgery // *Ophthalmology.* – 2017. – Vol. 124. – No. 10. – P. 1440-1441.
106. Bekesi N., Kochevar I.E., Marcos S. Corneal biomechanical response following collagen cross-linking with rose bengal-green light and Riboflavin-UVA // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2016. – Vol. 57. – P. 992-1001.

107. Braun E., Kanellopoulos J., Pe L., Jankov M. Riboflavin/Ultraviolet-A-induced collagen crosslinking in the management of keratoconus // ARVO. – 2005; www.iovs.org 4964/B167.
108. Brian S. Boxer Wachler. Corneal collagen crosslinking with riboflavin // Cataract Refract. Surg. Today. – 2005. – No. 1. – P. 73-74.
109. Caporossi A., Baiocchi S., Mazzotta C., Traversi C. Parasurgical therapy for keratoconus by riboflavin-ultraviolet type A rays induced cross-linking of corneal collagen: preliminary refractive results in an Italian study // J. Cataract Refract. Surg. – 2006. – Vol. 32. – No. 5. – P. 837-845.
110. Cassagne M., Laurent C., Rodrigues M. et al. Iontophoresis transcorneal delivery technique for transepithelial corneal collagen crosslinking with riboflavin in a rabbit model // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2016. – Vol. 57. – P. 594-603.
111. Celik H.U., Alagöz N., Yildirim Y. et al. Accelerated corneal crosslinking concurrent with laser in situ keratomileusis // J. Cataract Refract. Surg. – 2012. – Vol. 38. – P. 1424-1431.
112. Chan B.P., Hui T.Y., Chan O.C. et al. Photochemical cross-linking for collagen-based scaffolds: a study on optical properties, mechanical properties, stability and hemocompatibility // Tissue Eng. – 2007. – Vol. 13. – P. 73-85.
113. Chan B.P., So K.F. Photochemical crosslinking improves the physicochemical properties of collagen scaffolds // J. Biomed. Mater. Res. – 2005. – Vol. 75. – P. 689-701.
114. Cho K.C., Lien C.H., Lin C.Y. et al. Enhanced two-photon excited fluorescence in three-dimensionally crosslinked bovine serum albumin microstructures // Opt. Express. – 2011. – Vol. 19. – P. 11732-11739.
115. Cohen D., Chuk R., Berman G. et al. Ablation spectra of human cornea // J. Biomed. Optics. – 2001. – Vol. 6. – No. 3. – P. 339-343.
116. Cordeiro Barbosa M.M.V., Barbosa J.B. Jr., Hirai F.E., Hofling-Lima A.L. Effect of cross-linking on corneal thickness in patients with corneal edema // Cornea. – 2010. – Vol. 29. – No. 6. – P. 613-617.

117. Coskunseven E., Jankov M.R. 2nd, Hafezi F. et al. Effect of treatment sequence in combined intrastromal corneal rings and corneal collagen crosslinking for keratoconus // *J. Cataract Refract. Surg.* – 2009. – Vol. 35. – No. 12. – P. 2084-2091.
118. Coskunseven E., Jankov M.R., Hafezi F. Contralateral eye study of corneal collagen cross-linking with riboflavin and UVA irradiation in patients with keratoconus // *J. Refract. Surg.* – 2009. – Vol. 25. – No. 4. – P. 371-376.
119. Czech Z., Butwin A. UV-initiated crosslinking of acrylic pressuresensitive adhesives using ultraviolet excimer-laser // *Rev. Adv. Mater. Sci.* – 2010. – Vol. 23. – P. 32-36.
120. Czech Z., Kowalczyk J., Kabatc L., Shao Y. UV-initiated crosslinking of photoreactive acrylic pressure-sensitive adhesives using excimer-laser // *Polym. Bull.* – 2013. – Vol. 70. – P. 479-488.
121. Dan Z., Randleman B.J. Mathematical model to compare the relative tensile strength of the cornea after PRK, LASIK, and small incision lenticule extraction // *J. Refract. Surg.* – 2013. – Vol. 29. – P. 454-460.
122. Dawson D.G., Grossniklaus H.E., McCarey B.E., Edelhauser H.F. Biomechanical and wound healing characteristics of corneas after excimer laser keratorefractive surgery: is there a difference between advanced surface ablation and sub-Bowman's keratomileusis? // *J. Refract. Surg.* – 2008. – Vol. 1. – P. 90-96.
123. Daxer A., Fratzl P. Collagen fibril orientation in the human corneal stroma and its implication in keratoconus // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1997. – Vol. 38. – P. 121-129.
124. Daxer A., Mahmoud H.A., Venkateswaran R.S. Corneal crosslinking and visual rehabilitation in keratoconus in one session without epithelial debridement: new technique // *Cornea.* – 2010. – Vol. 29. – No. 10. – P. 1176-1179.
125. De Bernardo M., Capasso L., Tortori A. et al. Transepithelial corneal collagen crosslinking for progressive keratoconus: 6 months follow up// *Contact Lens & Anterior Eye.* – 2014. – Vol. 37. – Issue 6. – P. 438-441.

126. Eraslan M., Toker E., Cerman E., Ozarslan D. Efficacy of epithelium-off and epithelium-on corneal collagen cross-linking in pediatric keratoconus // *Eye & Contact Lens*. – 2016. – No. 2.
127. Estil S., Primo E.J., Wilson G. Apoptosis in shed human corneal cells // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. – 2000. – Vol. 41. – P. 3360-3364.
128. Fujimori E. Cross-linking and Fluorescence Changes of Collagen by Glycation and Oxidation // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1989. – Vol. 998. – No. 2. – P. 105-110.
129. Genth U., Mrochen M., Walti R. et al. Optical low coherence reflectometry for noncontact measurements of flap thickness during laser in situ keratomileusis // *Ophthalmology*. – 2002. – Vol. 109. – No. 5. – P.973-978.
130. Gore D.M., O'Brart D., French P., Dunsby C. Transepithelial riboflavin absorption in an ex vivo rabbit corneal model // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. – 2015. – Vol. 56. – P. 5006-5011.
131. Gu S., Fan Z., Wang L., Tao X., Zhang Y., Mu G. Corneal collagen cross-linking with hypoosmolar riboflavin solution in keratoconic corneas // *BioMed Research International*. – 2014. – Vol. 2014. – Article ID 754182. – 6 pages.
132. Guillet J. *Polymer photophysics and photochemistry*. – Cambridge: Cambridge University Press, 1985.
133. Hafezi F., Seiler T. Reply: Crosslinking for iatrogenic keratectasia after LASIK and for keratoconus // *J. Cataract Refract. Surg*. – 2008. – Vol. 34. – No. 6. – P. 879.
134. Hafezi N., Hafezi F. How to choose the best cross-linking procedure in 2016 // *Eur. Ophthalmic Rev*. – 2015. – Vol. 9. – No. 2. – P. 98-99.
135. Hafezi F., Kanellopoulos J., Wiltfang R., Seiler T. Corneal collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet A to treat induced keratectasia after laser in situ keratomileusis // *J. Cataract Refract. Surg*. – 2007. – Vol. 33. – P. 2035-2040.

136. Hafezi F., Koller T., Vinciguerra P., Seiler T. Marked remodelling of the anterior corneal surface following collagen cross-linking with riboflavin and UVA // *Br. J. Ophthalmol.* – 2011. – Vol. 95. – No. 8. – P. 1171-1172.
137. Hafezi F., Mrochen M., Iseli HP., Seiler T. Collagen crosslinking with ultraviolet-A and hypoosmolar riboflavin solution in thin corneas // *J. Cataract Refract. Surg.* – 2009. – Vol. 35. – No. 4. – P. 621-624.
138. Hafezi F., Seiler T. Persistent subepithelial haze in thin-flap LASIK // *J. Refract. Surg.* – 2010. – Vol. 26. – No. 3. – P. 222-225.
139. Hammer A., Kling S., Boldi M. et al. Establishing corneal cross-linking with riboflavin and UV-A in the mouse cornea in vivo: Biomechanical analysis// *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2015. – Vol. 56. – No. 11. – P. 6581.
140. Hammer A., Richoz O., Arba Mosquera S. et al. Corneal biomechanical properties at different corneal cross-linking (CXL) irradiances // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2014. – Vol. 55. – No. 5. – P. 2881-2884.
141. Hammer A., Rudaz S., Guinchart S. et al. Analysis of riboflavin compounds in the rabbit cornea in vivo // *Curr. Eye Res.* – 2016. – No. 1. – P. 1-7.
142. Hashemi H., Miraftab M., Seyedian M.A. et al. Long-term results of an accelerated corneal cross-linking protocol (18 mW/cm²) for the treatment of progressive keratoconus // *Am. J. Ophthalmol.* – 2015. – Vol. 160. – Issue 6. – P. 1164-1170.
143. Hassan Z., Modis L. Jr., Szalai E., Berta A. Intraoperative and postoperative corneal thickness change after collagen crosslinking therapy // *Eur. J. Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 24. – No. 2. – P. 179-185.
144. Hayes S., Morgan S. R., O'Brart D.P., O'Brart N., Meek K.M. A study of stromal riboflavin absorption in ex vivo porcine corneas using new and existing delivery protocols for corneal cross-linking // *Acta Ophthalmologica.* – 2016. – Vol. 94. – Issue 2. – P. 109-117.
145. Heitz J., Arenholtz E., Phillips H.M. Femtosecond excimer-laser-induced structure formation on polymers // *Appl. Phys.* – 1994. – Vol. 52. – P. 289-293.

146. Herold T., Seiler T., Egensperger R. et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after treatment with rituximab, fludarabine and cyclophosphamide in a patient with chronic lymphocytic leukemia // *Leuk Lymphoma*. – 2012. – Vol. 53. – No. 1. – P. 169-72.
147. Hockensmith J.W., Kubasek W.L., Vorachek W.R., Von Hippel P.H. Laser crosslinking of nucleic acids to proteins // *J. Biological Chemistry*. – 1986. – Vol. 261. – P. 3512-3518.
148. Iosin M., Stephan O., Astilean S., Dupperay A. Microstructuration of protein matrices by laser-induced photochemistry // *J. Optoelectronics and Advanced Materials*. – 2007. – Vol. 9. – P. 716-720.
149. Iseli H.P., Spoerl E., Wiedemann P., Krueger R.R., Seiler T. Efficacy and safety of blue-light scleral cross-linking // *J. Refract. Surg.* – 2008. – Vol. 24. – No. 7. – P. 752-755.
150. Jonas J., Vossmerbaeumer U. Femtoseconde laser lasik flap preparation with conical incision and positional spikes // *J. Cataract Refract. Surg.* – 2004. – Vol. 30. – P. 1107-1108.
151. Juhasz T., Kastis G.A., Suarez C., Bor Z. Time-resolved observations of shock waves and cavitation bubbles generated by femtosecond laser pulses in corneal tissue and water // *Lasers Surg. Med.* – 1996. – Vol. 19. – No. 1. – P. 23-31.
152. Juhasz T., Loesel F.H., Kurtz R.M. et al. Corneal refractive surgery with femtosecond lasers // *IEEE J. Selected Topics in Quantum Electronics*. – 1999. – Vol. 5. – P. 902-910.
153. Kanellopoulos J. Comparison of sequential vs same-day simultaneous collagen cross-linking and topography-guided PRK for treatment of keratoconus // *J. Refract. Surg.* – 2009. – Vol. 25. – P. 812-818.
154. Kanellopoulos J. Preventing ectasia with cross-linking after PRK or LASIK // *J. Cataract Refract. Surg.* – 2012. – P. 50-54.
155. Kaufman H.E. Strengthening the Cornea // *Cornea*. – 2004. – Vol. 23. – P. 432.

156. Kawamura Y., Toyoda K., Namba S. Effective deep ultraviolet photoetching of polyethylacrylate by an excimer laser // *Appl. Phys. Lett.* – 1982. – Vol. 40. – P. 374.
157. Kenney M.C., Nesburn A.B., Burgeson R.E., Butkowski R.J., Abnormalities of the extracellular matrix in keratoconus corneas // *Cornea.* – 1997. – Vol.1 6. – P. 345-351.
158. Kezirian G., Stonecipher K. Comparison of the Intralase femtosecond laser and mechanical keratomes for laser in situ keratomileusis // *J. Cataract Refract. Surg.* – 2004. – Vol. 30. – P. 804-811.
159. Khandelwal S.S., Randleman J.B. Current and future applications of corneal cross-linking // *Cur. Opinion in Ophthalmol.* – 2015. – Vol. 26. – Issue 3. – P. 206-213.
160. Kling S., Hafezi F. An algorithm to predict the biomechanical stiffening effect in corneal cross-linking // *J. Refract. Surg.* – 2017. – Vol. 32. – P. 128-136.
161. Kling S., Remon L., Perez-Escudero A., Merayo-Llodes J. Corneal biomechanical changes after collagen cross-linking from porcine eye inflation experiments // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2010. – Vol. 51. – P. 3961-3968.
162. Kohlhaas M., Spoerl E., Schilde T. et al. Biomechanical evidence of the distribution of cross-links in corneas treated with riboflavin, ultraviolet a light // *J. Cataract Refract. Surg.* – 2006. – Vol. 32. – P. 279-283.
163. Kohlhaas M., Spoerl E., Speck A. et al. A new treatment of keratectasia after LASIK by using collagen with riboflavin/UVA light crosslinking // *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* – 2005. – Vol. 222. – P. 430-436.
164. Koller T., Iseli H.P., Hafezi F., Vinciguerra P. Scheimpflug imaging of corneas after collagen cross-linking // *Cornea.* – 2009. – Vol. 28. – No. 5. – P. 510-515.
165. Koller T., Mrochen M., Seiler T. Complication and failure rates after corneal crosslinking // *J. Cataract Refract. Surg.* – 2009. – Vol. 35. – No. 8. – P. 1358-1362.

166. Koller T., Pajic B., Vinciguerra P., Seiler T. Flattening of the cornea after collagen crosslinking for keratoconus // *J. Cataract Refract. Surg.* – 2011. – Vol. 37. – No. 8. – P. 1488-1492.
167. Kozobolis V., Grika M., Labiris G. Corneal collagen cross-linking using riboflavin and ultraviolet-A irradiation in keratitis treatment // *Keratitits.* – 2012. – Vol. 4. – P. 362-367.
168. Krueger R.R., Herekar S., Spoerl E. First proposed efficacy study of high versus standard irradiance and fractionated riboflavin/ultraviolet a cross-linking with equivalent energy exposure // *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice.* – 2014. – Vol. 40. – Issue 6. – P. 353-357.
169. Kymionis G.D., Bouzoukis D.I., Diakonis V.F. Diffuse lamellar keratitis after corneal crosslinking in a patient with post-laser in situ keratomileusis corneal ectasia // *J. Cataract Refract. Surg.* – 2007. – Vol. 12. – P. 2135-2137.
170. Kymionis G.D., Grentzelos M.A., Kankariya V.P. et al. Safety of high-intensity corneal collagen crosslinking // *J. Cataract Refract. Surg.* – 2014. – Vol. 40. – No. 8. – P. 1337-1340.
171. Kymionis G.D., Tsoulnaras K.I., Grentzelos M.A. et al. Evaluation of corneal stromal demarcation line depth following standard and a modified-accelerated collagen cross-linking protocol // *Am. J. Ophthalmol.* – 2015. – Vol. 158. – Issue 4. – P. 671-675.
172. Leo G., Altucci C., Bourgoin-Voillard S. et al. Ultraviolet laser-induced cross-linking in peptides // *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* – 2013. – Vol. 27. – P. 1660-1668.
173. Lin J.T. Photochemical kinetic modeling for oxygen- enhanced uv-light-activated corneal collagen crosslinking // *Ophthalmol. Res.* – 2017. – Vol. 7 – No. 1. – P. 1-8, 201.
174. Lippert J., Dickinson J.T. et al. Polymers Designed for Laser Ablation-influence of Photochemical Properties // *App. Surf. Sci.* – 2002. – Vol. 197-198. – P. 746-756.

175. Lombardo G., Micali N.L., Villari V., Serrao S. All-optical method to assess stromal concentration of riboflavin in conventional and accelerated UV-A irradiation of the human cornea // *Invest.Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2016. – Vol. 57. – P. 476-483.
176. Lombardo M., Pucci G., Barberi R., Lombardo G. Interaction of ultraviolet light with the cornea: clinical implications for corneal crosslinking // *J. Cataract Refract. Surg.* – 2015. – Vol. 41. – No. 2. – P. 446-459.
177. Lombardo M., Serrao S., Rosati M., Ducoli P. Biomechanical changes in the human cornea after transepithelial corneal crosslinking using iontophoresis // *J. Refract. Surg.* – 2014. – Vol. 40. – Issue 10. – P. 1706-1715.
178. Lubatschowski H., Kermani O. 193 nm Excimer laser photoablation of the cornea. Spectrum and transmission behavior of secondary irradiation // *Ophthalmology.* – 1992. – Vol. 89. – No. 2. – P. 134-138.
179. Lubatschowski H., Kermani O., Otten C. et al. ArF-excimer laser-induced secondary radiation in photoablation of biological tissue // *Lasers Surg. Med.* – 1994. – Vol. 14. – No. 2. – P. 168-177.
180. Lubatschowski H., Maatz G., Heisterkamp A. et al. Application of ultrashort laser pulses for intrastromal refractive surgery // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2000. – Vol. 238. – No.1. – P. 33-39.
181. Mangioris G.F., Papadopoulou D.N., Balidis M.O. et al. Corneal infiltrates after corneal collagen cross-linking // *J. Refract. Surg.* – 2010. – Vol. 26. – No. 8. – P. 609-611.
182. Mastropasqua L., Nubile M., Calien N. R. et al. Corneal cross-linking: intrastromal riboflavin concentration in iontophoresis-assisted imbibition versus traditional and transepithelial techniques // *Am. J. Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 157. – No. 3. – P. 623-630.
183. Mazzotta C., Balestrazzi A., Biaocchi S. et al. Stromal haze after combined riboflavin-UVA corneal collagen cross-linking in keratokonus: in vivo confocal microscopic evaluation // *Clin. Experiment Ophthalmol.* – 2007. – Vol. 35. – P. 580-582.

184. Mazzotta C., Balestrazzi A., Traversi C. et al. Treatment of progressive keratoconus by riboflavin-UVA-induced cross-linking of corneal collagen: ultrastructural analysis by Heidelberg Retinal Tomograph II in vivo confocal microscopy in humans // *Cornea*. – 2007. – Vol. 26. – P. 390-397.
185. Mazzotta C., Caragiuli S. Intraoperative corneal thickness measurement by optical coherence tomography in keratoconic patients undergoing corneal collagen cross-linking // *Am. J. Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 157. – Issue 6. – P. 1156-1162.
186. Mazzotta C., Traversi C., Paradiso A.L., Latronico M.E., Rechichi M. Pulsed light accelerated crosslinking versus continuous light accelerated crosslinking: one-year results // *J. Ophthalmol.* – 2014. – ID 604731.
187. Meek K.M., Tuft S.J., Huang Y. et al. Changes in Collagen Orientation and Distribution in Keratoconus Corneas // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2005. – Vol. 46. – P. 1948-1956.
188. Mencucci R., Marini M., Paladini I. et al. Effects of riboflavin/UVA corneal cross-linking on keratocytes and collagen fibres in human cornea // *Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2010. – Vol. 38. – P. 49-56.
189. Mencucci R., Mazzotta C., Corvi A. et al. In vivo thermographic analysis of the corneal surface in keratoconic patients undergoing riboflavin-UV-A accelerated cross-linking // *Cornea*. – 2015. – Vol. 34. – Issue 3. – P. 323-327.
190. Mrochen M. Current status of accelerated corneal cross-linking // *Ind. J. Ophthalmol.* – 2013. – Vol. 8. – P. 428-429.
191. Nordan L.T., Slade S.G., Baker R.N. et al. Femtosecond laser flap creation for laser in situ keratomileusis: six months followup of initial US clinical studies // *J. Refract. Surg.* – 2003. – Vol. 19. – P.8-14.
192. Patel S.V., McLaren J.W., Hodge D.O., Bourne W.M. Normal human keratocyte density and corneal thickness measurement by using confocal microscopy // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2001. – Vol. 42. – No. 2. – P. 333-339.

193. Perez-Santonja J.J., Artola A., Javaloy J. et al. Microbial keratitis after corneal collagen crosslinking // *J. Cataract Refract. Surg.* – 2009. – Vol. 35. – No. 6. – P. 1138-1140.
194. Podskochy A. Protective role of corneal epithelium against ultraviolet radiation damage // *Acta Ophthalmol. Scand.* – 2004. – Vol. 82. – P. 714-717.
195. Quesnel N.M., Fares F., Verret E., Giasson C. Evaluation of the spectral transmittance of UV-absorbing disposable contact lenses // *CLAO J.* – 2001. – Vol. 27. – No. 1. – P. 21-29.
196. Quurke A., Schmidt-Petersen H., Seiler T. Complications in photorefractive keratectomy for myopia correction // *Ophthalmologe.* – 1998. – Vol. 95. – No. 10. – P. 734-740.
197. Raiskup F., Hoyer A., Spoerl E. Permanent corneal haze after riboflavin-UVA-induced cross-linking in keratokonus // *J. Refract. Surg.* – 2009. – Vol. 25. – P. 824-828.
198. Raiskup F., Theuring A., Pillunat L.E., Spoerl E. Corneal collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in progressive keratoconus: Ten-year results // *J. Cataract Refract. Surg.* – 2015. – Vol. 41. – Issue 1. – P. 41-46.
199. Raiskup-Wolf F., Hoyer A., Spoerl E., Pillunat L.E. Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: long term results // *J. Cataract Refract. Surg.* – 2008. – Vol. 34. – P. 796-801.
200. Ranby B., Rabek J.F. Photodegradation, photooxidation, and photostabilization of polymers. – London: Wiley, 1975.
201. Rehnman J.B., Lindén C., Hallberg P., Behndig A. Treatment effect and corneal light scattering with 2 corneal cross-linking protocols: A randomized clinical trial // *JAMA Ophthalmology.* – 2015. – Vol. 133. – No. 11. – P. 254-1260.
202. Reinstein D.Z., Archer T.J., Randleman J. B. Mathematical model to compare the relative tensile strength of the cornea after PRK, LASIK and small incision lenticule extraction // *J. Refract. Surg.* – 2013. – Vol. 7. – P. 454-460.

203. Richoz O., Hammer A., Tabibian D., Gatzoufas Z., Hafezi F. The biomechanical effect of corneal collagen crosslinking (CXL) with riboflavin and UVA is oxygen dependent // *Transl. Vis. Sci. Technol.* – 2013. – Vol. 2. – P. 6.
204. Sady C., Khosrof S., Nagaraj R. Advanced Maillard reaction and crosslinking of corneal collagen in diabetes // *Biochim. Biophys. Res. Commun.* – 1995. – Vol. 214. – No. 3. – P. 793-797.
205. Samarawickrama C., Chan E., Loughnan M., Snibson G.R. Importance of corneal saturation time with riboflavin prior to collagen cross-linking // *Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2016. – Vol. 44. – No. 3. – P. 196-197.
206. Sandvik G.F., Thorsrud A., Raen M. et al. Does corneal collagen cross-linking reduce the need for keratoplasties in patients with keratoconus // *Cornea.* – 2015. – Vol. 34. – P. 991-995.
207. Schmack I., Dawson D.G., McCarey B.E. et al. Cohesive tensile strength of human LASIK wounds with histologic, ultrastructural, and clinical correlations // *J. Refract. Surg.* – 2005. – Ch. 21. – Vol. 5. – P. 433-445.
208. Schumacher S., Mrochen M., Spoerl E. Absorption of UV-light by riboflavin solutions with different concentration // *J. Refract Surg.* – 2012. – Vol. 28. – P. 91-92.
209. Schumacher S., Mrochen M., Wernli J., Bueeler M. Optimization model for UV-riboflavin corneal cross-linking // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2012. – Vol. 53. – No. 2. – P. 762-769.
210. Seiler T., Hafezi F. Corneal cross-linking-induced stromal demarcation line // *Cornea.* – 2006. – Vol. 25. – No. 9. – P. 1057-1059.
211. Seiler T., Quurke A.W. Iatrogenic keratectasia after LASIK in a case of forme fruste keratoconus // *J. Cataract Refract. Surg.* – 1998. – Vol. 24. – No. 7. – P. 1007-1009.
212. Seiler T., Wollensak J. Complications of laser keratomileusis with the excimer laser (193 nm) // *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* – 1992. – Vol. 200. – No. 6. – P. 648-53.

213. Seiler T. Iatrogenic corneal ectasia after LASIK is the end in sight? // *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* – 2005. – Vol. 222. – No. 5. – P. 429.
214. Seiler T. Iatrogenic keratectasia: academic anxiety or serious risk? // *J. Cataract Refract. Surg.* – 1999. – Vol. 25. – No. 10. – P. 1307-1308.
215. Seiler T. Refractive surgical problem // *J. Cataract Refract. Surg.* – 2000. – Vol. 26. – No. 8. – P. 1111.
216. Seiler T., Bende T., Wollensak J. Use of far UV light in photoablation of the cornea // *Fortschr. Ophthalmol.* – 1986. – Vol. 83. – No. 5. – P. 556-558.
217. Seiler T., Bende T., Winckler K., Wollensak J. Side effects in excimer corneal surgery. DNA damage as a result of 193 nm excimer laser radiation // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* – 1988. – Vol. 226. – No. 3. – P. 273-276.
218. Seiler T., Hafezi F., Iseli H.P., Koller T. Reoperations after LASIK // *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* – 2006. – Vol. 223. – No. 6. – P. 509-512.
219. Seiler T., Koufala K., Richter G. Iatrogenic keratectasia after laser in situ keratomileusis // *J. Refract. Surg.* – 1998. – Vol. 14. – No. 3. – P. 312-317.
220. Seiler T., Kriegerowski M., Kahle G., Wollensak J. Excimer laser keratomileusis for myopia correction. Results and complications // *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* – 1991. – Vol. 199. – No. 3. – P. 153-159.
221. Seiler T., Kriegerowski M., Schnoy N., Bende T. Ablation rate of human corneal epithelium and Bowman's layer with the excimer laser (193 nm) // *Refract. Corneal Surg.* – 1990. – Vol. 6. – No. 2. – P. 99-102.
222. Seiler T., Matallana M., Sendler S., Bende T. Does Bowman's layer determine the biomechanical properties of the cornea? // *Refract. Corneal Surg.* – 1992. – Vol. 8. – No. 2. – P. 139-142.
223. Seiler T.G., Fischinger I., Senfft T., Schmidinger G. Intrastromal application of riboflavin for corneal crosslinking // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2014. – Vol. 55. – No. 7. – P. 4261-4265.
224. Semchishen A., Mrochen M., Semchishen V. Model for optimization of the UV-A/riboflavin strengthening (cross-linking) of the cornea: percolation threshold // *Photochem. Photobiol.* – 2015. – Vol. 91. – P. 1403-1411.

225. Sherif A.M., El-Gheriany N.A., Salah El-Din Y.M. et al. Intraoperative corneal thickness changes during pulsed accelerated corneal cross-linking using isotonic riboflavin with HPMC // *J. Ophthalmol.* – 2016. – Vol. 2016. – Article ID 1471807. – 4 pages.
226. Soderberg P.G., Michael R., Merriam J.C. Maximum acceptable dose of ultraviolet radiation: a safety limit for cataract // *Acta Ophthalmol Scand.* – 2013. – Vol. 81. – No. 2. – P. 165-169.
227. Soergel F., Jean B., Seiler T. et al. Dynamic mechanical spectroscopy of the cornea for measurement of its viscoelastic properties in vitro // *German J. Ophthalmol.* – 1995. – No. 4. – P. 151-156.
228. Soeters N., Wisse R.P.L., Godefrooij D.A., Saskia M. Transepithelial versus epithelium-off corneal cross-linking for the treatment of progressive keratoconus: a randomized controlled trial // *Am. J. Ophthalmol.* – 2015. – Vol. 159. – Issue 5. – P. 821-828.
229. Spoerl E., Huhle M., Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue // *Exp. Eye Res.* – 1998. – Vol. 66. – No. 1. – P. 97-103.
230. Spoerl E., Huhle M., Kasper M., Seiler T. Increased rigidity of the cornea caused by intrastromal cross-linking // *Ophthalmology.* – 1997. – Vol. 94. – No. 12. – P. 902-906.
231. Spoerl E., Mrochen M., Sliney D., Trokel S. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea // *Cornea.* – 2007. – Vol. 26. – No. 4. – P. 385-389.
232. Spoerl E., Schreiber J., Hellmund K., Seiler T. Crosslinking Effects in the cornea of Rabbits // *Ophthalmology.* – 2000. – Vol. 97. – P. 203-206.
233. Spoerl E., Wollensak G., Dittert D., Seiler T. Thermomechanical Behavior of Collagen-Crosslinked Porcine Cornea // *Ophthalmologica.* – 2004. – Vol. 218. – P. 136-140.
234. Spoerl E., Wollensak G., Seiler T. Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion // *Cur. Eye Research.* – 2004. – Vol. 29. – P. 35-40.

235. Sporn E., Genth U., Schmalfluss K., and Seiler T. Thermo-mechanical behavior the cornea // *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* – 1996. – Vol. 208. – No. 2. – P. 112-116.
236. Srinivasan R., Mayne-Banton V. Self-developing photoetching of poly(ethylene terephthalate) films by far-ultraviolet excimer laser radiation // *Appl. Phys. Letts.* – 1982. – Vol. 41. – P. 576.
237. Srinivasan R., Wynne J., Blum S. Controlled photoetching of organic material by far-ultraviolet (193 nm) laser radiation // *Laser Focus.* – 1983. – Vol. 19. – P. 63.
238. Stojanovic A., Zhou W., Utheim T.P. Corneal collagen cross-linking with and without epithelial removal: a contralateral study with 0.5% hypotonic riboflavin solution // *BioMed Research International.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 9.
239. Sutcliffe E., Srinivasan R. Dynamics of UV-laser ablation of organic polymer surfaces // *J. Appl. Phys.* – 1986. – Vol. 60. – P. 3315-3322
240. Taneri S., Oehler S., Lytle G., Dick H.B. Evaluation of epithelial integrity with various transepithelial corneal cross-linking protocols for treatment of keratoconus // *J. Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 5.
241. Thomas D.W., Foulkers-Williams C., Rumsby P.T., Gower C. Surface modification of polymers and ceramics induced by excimer laser radiation // *Laser Ablation of Electronic Materials.* – 1992. – Vol. 1. – P. 1-8.
242. Touboul D., Efron N., Smadja D., Praud D., Malet F., Colin J. Corneal confocal microscopy following conventional, transepithelial, and accelerated corneal collagen cross-linking procedures for keratoconus // *J. Refract. Surg.* – 2012. – Vol. 11. – P. 769-776.
243. Torkel S.L., Srinivasan R., Baren B. Laser surgery of the cornea // *Am. J. Ophthalmol.* – 1983. – Vol. 96. – P. 710.
244. Tsao S., Yao M., Tsao H. et al. Light-activated tissue bonding for excisional wound closure: a split-leson clinical trial // *Br. J. Dermatol.* – 2012. – Vol. 166. – P. 555-563.

245. Tuft S., Al-Dhahir R., Dyer P., Zahao Z. Characterization of fluorescence spectra produced by excimer laser irradiation of cornea // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1989. – Vol. 31. – P. 1512-1518.
246. Ursu C., Bordianu I., Dobromir M. et al. Excimer Laser-Induced Surface Modification of Poly(Ethylene) Terephthalate // *Rev. Roum. Chim.* – 2012. – Vol. 57. – P. 501-506.
247. ValenzeN. D.P., Pooler J.P. Cell membrane photomodification: Relative effectiveness of halogenated fluoresceins for photohemolysis // *Photochem Photobiol.* – 1982. – Vol. 35. – P. 343-350.
248. Verter E.E., Gisel T.E., Yang P. et al. Light-initiated bonding of amniotic membrane to cornea // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2011. – Vol. 9. – P. 9470-9477.
249. Vinciguerra P., Albè E., Trazza S. et al. Refractive, topographic, tomographic, and aberrometric analysis of keratoconic eyes undergoing corneal cross-linking // *Ophthalmology.* – 2009. – Vol. 116. – No. 3. – P. 369-378.
250. Vinciguerra P., Albè E., Trazza S., Seiler T. Intraoperative and postoperative effects of corneal collagen cross-linking on progressive keratoconus // *Arch. Ophthalmol.* – 2009. – Vol. 127. – No. 10. – P. 1258-1265.
251. Vinciguerra P., Randleman J.B., RomaN. V. et al. Transepithelial iontophoresis corneal collagen cross-linking for progressive keratoconus: initial clinical outcomes // *J. Refract. Surg.* – 2014. – Vol. 30. – Issue 11. – P. 746-753.
252. Wan Q., Wang D., Ye H. et al. A review and meta-analysis of corneal cross-linking for post-laser vision correction ectasia // *J. Curr. Ophthalmol.* – 2017. – Vol. 29. – No. 3. – P. 145-153.
253. Weadock K.S., Miller E.J., Bellincampi L.D. et al. Physical crosslinking of collagen fibers: comparison of ultraviolet irradiation and dehydrothermal treatment // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1995. – Vol. 29. – No. 11. – P. 1373-1379.
254. Wernli J., Schumacher S., Spoerl E., Mrochen M. The efficacy of corneal cross-linking shows a sudden decrease with very high intensity UV light

and short treatment time // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2013. – Vol. 54. – No. 2. – P. 1176-1180.

255. Wisse R.P., Godefrooij D.A., Soeters N., Imhof S.M. A multivariate analysis and statistical model for predicting visual acuity and keratometry one year after corneal cross-linking for keratoconus // Am. J. Ophthalmol. – 2014. – Vol. 157. – No. 3. – P. 519-525.

256. Wittig-Silva C., Chan E., Islam F.M.A. et al. A randomized, controlled trial of corneal collagen cross-linking in progressive keratoconus: three-year results // Ophthalmology. – 2014. – Vol. 121. – Issue 4. – P. 812-821.

257. Wollensak G., Aurich H., Wirbelauer C. Significance of the riboflavin film in corneal collagen crosslinking // J. Cataract Refract. Surg. – 2010. – Vol. 36. – P. 114-120.

258. Wollensak G., Iomdina, E. Long-term biomechanical properties of rabbit cornea after photodynamic collagen crosslinking // Acta Ophthalmol. – 2009. – Vol. 87. – P. 48-51.

259. Wollensak G., Spoerl E., Reber F., Seiler T. Keratocyte cytotoxicity of riboflavin/UVA-treatment in vitro // Eye. – 2004. – Vol. 18. – No. 7. – P. 718-722.

260. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Riboflavin/Ultraviolet-A Induced Collagen Crosslinking for the treatment of keratokonus // Am. J. Ophthalmol. – 2003. – Vol. 135. – P. 620-627.

261. Wollensak G., Spoerl E., Seiler Th. Stress strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin/ultraviolet-A induced crosslinking // J. Cataract Refract. Surg. – 2003. – Vol. 29. – P. 1780-1785.

262. Wollensak G., Spoerl E., Wilsch M., Seiler T. Keratocyte apoptosis after corneal collagen cross-linking using riboflavin/UVA treatment // Cornea. – 2004. – Vol. 23. – No. 1. – P. 43-49.

263. Wollensak G., Spoerl E., Wilsch M., Seiler T. Endothelial cell damage after riboflavinultraviolet-A treatment in the rabbit // J. Cataract Refract. Surg. – 2003. – Vol. 29. – P. 1786-1790.

264. Wollensak G., Sporl E., Seiler T. Treatment of keratoconus by collagen cross linking // *Ophthalmologe.* – 2003. – Vol. 100. – No. 1. – P. 44-49.
265. Wollensak G., Sporl E., Reber F., Pillunat L. Corneal endothelial cytotoxicity of riboflavin/UVA treatment in vitro // *Ophthalmic Res.* – 2003. – Vol. 35. – P. 324-328.
266. Wollensak G., Wilsch M., Spoerl E., Seiler T. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA // *Cornea.* – 2004. – Vol. 23. – No. 5. – P. 503-507.
267. Zakaria R., Scott R.M. Interaction of 157 nm Laser on Pristine and Radiation Exposed CR39 Polymer // *App. Surf. Sci.* – 2013. – Vol. 274. – P. 53-59.
268. Zaldaway R.M., Wagner J., Ching S., Seigel G.M. Evidence of Apoptotic Cell Death in Keratoconus // *Cornea.* – 2002. – Vol. 21. – P. 206-209.
269. Zhang X., Tao X.C., Zhang J. et al. A review of collagen cross-linking in cornea and sclera // *J. Ophthalmol.* – 2015. – Vol. 2015. – 2 p.
270. Zhang Y., Li Z., Liu L. et al. Comparison of riboflavin/ultraviolet-A cross-linking in porcine, rabbit, and human sclera // *BioMed. Research International.* – 2014. – Vol. 2014. – 5 p.
271. Zuclich J.A. Ultraviolet-induced photochemical damage in ocular tissues // *Health Phys.* – 1989. – Vol. 56. – P. 671-682.