

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«МЕЖОТРАСЛЕВОЙ НАУЧНО – ТЕХНИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС
«МИКРОХИРУРГИЯ ГЛАЗА» ИМЕНИ АКАДЕМИКА С.Н. ФЕДОРОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ЛОШКАРЕВА АНАСТАСИЯ ОЛЕГОВНА

**ТЕРАПИЯ ХРОНИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ЭПИТЕЛИЗАЦИИ
РОГОВИЦЫ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ЭТИОЛОГИИ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АУТОЛОГИЧНОЙ БОГАТОЙ
ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ**

14.01.07 - глазные болезни

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
Майчук Дмитрий Юрьевич

Москва 2018г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Этиопатогенез нарушений эпителизации роговицы хронического течения.....	10
1.1.1. Вероятная этиологическая роль герпетической инфекции в формировании хронических нарушений эпителизации роговицы.....	11
1.1.2. Характерные клинические проявления и морфологические особенности герпесвирусных хронических нарушений эпителизации роговицы.....	14
1.2. Методы диагностики хронических нарушений эпителизации роговицы герпесвирусной этиологии	19
1.3. Методы консервативного лечения хронических нарушений эпителизации роговицы герпесвирусной этиологии.....	23
1.3.1. Специфическая противовирусная терапия.....	24
1.3.2. Специфическая противогерпетическая терапия.....	26
1.3.3. Слезозаместительная и репаративная терапия.....	28
1.3.4. Профилактика вторичной бактериальной инфекции.....	33
1.3.5. Роль нестероидных противовоспалительных препаратов.....	33
1.3.6. Применение бандажных мягких контактных линз.....	34
1.4. Хирургическое лечение хронических нарушений эпителизации роговицы.....	35
1.4.1. Микродиатермокоагуляция при лечении герпетических кератитов.	36
1.4.2. Применение лазерных технологий при лечении нарушений эпителизации роговицы.....	37
1.5. Альтернативные методы терапии хронических нарушений эпителизации роговицы.....	38
1.5.1. Применение аутологичной сыворотки.....	38
1.5.2. Применение богатой тромбоцитами плазмы.....	40
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	43
2.1. Анализ доли изолированного и сочетанного инфицирования ВПГ 1, 2 типов и цитомегаловируса у пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы.....	43
2.2. Экспериментальное исследование по оценке стерильности препарата богатой тромбоцитами плазмы.....	46
2.3. Клиническая оценка терапевтического эффекта богатой тромбоцитами плазмы изолированно и в сочетании с 0,01% сульфатированными гликозаминогликанами.....	47

2.3.1. Характеристика клинических групп.....	47
2.3.2. Схемы лечения в группах.....	49
2.3.3. Клинико-функциональные методы исследования.....	54
2.4. Статистические методы.....	59
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	60
3.1. Результаты анализа доли изолированного и сочетанного инфицирования ВПГ 1, 2 типов и цитомегаловируса у пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы.....	61
3.1.1. Соотношение данных результатов иммуноферментного анализа крови у пациентов с хроническими нарушениями эпителизации.....	62
3.1.2. Выбор противовирусных лекарственных препаратов при дальнейшем ведении пациентов исследуемой группы.....	63
3.1.3. Описание особенностей клинической картины возможных вариантов течения сочетанной герпетической и цитомегаловирусной инфекции.....	64
3.2. Результаты микробиологического исследования отделяемого конъюнктивы у пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы.....	74
3.3. Анализ стерильности аутологичной БоТП при хранении.....	76
3.4. Разработка этапной методики терапии у пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы герпетической этиологии.....	79
3.5. Результаты исследования по эффективности применения БоТП изолированно и в сочетании с гликозаминогликанами.....	80
3.5.1. Результаты первичной диагностики пациентов, включенных в исследование.....	81
3.5.2. Результаты лабораторной диагностики пациентов, включенных в исследование.....	84
3.5.3. Динамика результатов восстановления целостности роговицы в сравниваемых группах.....	85
3.5.4. Осложнения, возникшие в ходе проведения клинической части исследования.....	94
3.5.5. Дальнейшая тактика ведения пациентов без полной эпителизации роговицы.....	95
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	97
ВЫВОДЫ.....	109
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	111
ОСНОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	114

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Среди обращений пациентов с жалобами на покраснение глаз большая часть случаев приходится на инфекционную патологию, при этом на долю кератитов, как проявления инфекционных заболеваний глаз – около 4,2% от общего числа нозологий (Майчук Ю.Ф., 1999).

Эрозии роговицы представляют собой хронический процесс, причиной которого является нарушение адгезии эпителия роговицы к Боуеновой мембране. Пусковым механизмом в их развитии чаще всего являются: хирургическое вмешательство, травма роговицы, перенесенный кератит в анамнезе. Более чем в половине случаев рецидивирующая эрозия роговицы ассоциирована с герпетической инфекцией (Каспарова Е.А., Каспаров А.А., Марченко Н.Р., 2010.; Diez-Feijyo E., Grau A., 2014). У пациентов, как правило, присутствуют неспецифические жалобы на покраснение, слезотечение и болевой синдром. При затяжном, рецидивирующем течении к этому периодически добавляется боль при открывании глаз по утрам, возникающая как следствие повторной травматизации свежего нарастающего роговичного эпителия (Майчук Д.Ю., 2004; Brown N., Bron A., 1976).

В настоящий момент расширились варианты трактовки клинических проявлений кератитов герпесвирусной этиологии, в практике часто встречаются случаи их неклассической биомикроскопической картины, проявляющиеся в различной локализации, форме и размерах поражения роговицы. Это значительно усложняет процесс дифференциальной диагностики, т.к. в случае отсутствия классической клинической картины герпетического эпителиального «древовидного» поражения, патологический процесс принимается лечащими врачами за бактериальное, либо токсико-аллергическое поражение. Одновременно с этим, несмотря на то, что в литературе описано цитомегаловирусное поражение, проявляющееся на роговице в виде эндотелиита, выявить прямую связь цитомегаловирусного

инфицирования с причиной кератита крайне сложно (Чернакова Г.М., Аржиматова Г.Ш., Клещева Е.А., 2014).

На сегодняшний день предложенные методы лечения хронических нарушений эпителизации далеко не всегда приводят к полному регрессу симптомов заболевания и его проявлений. Применение слезозаместителей и репаративных препаратов различной степени вязкости, а также бандажных мягких контактных линз значительно улучшило прогноз терапии данных состояний, однако часто не является залогом обязательной эпителизации роговицы. Соответственно, попытки разработать новые, альтернативные методы терапии в настоящий момент являются важным, актуальным направлением (Jones L., MacDougall N., Sorbara L., 2002; Geerling G., MacLennan S., Hartwig D., 2004).

Одним из таких направлений является применение богатой тромбоцитами плазмы, обладающей репаративным действием, главным образом за счет наличия в своем составе повышенного содержания трофических факторов (Alio J.L., Pastor S., Ruiz-Colecha J., 2007; Sampson S., 2008).

Данная методика показала положительные результаты в различных областях медицины: косметологии, травматологии и ортопедии, стоматологии, а также применялась в офтальмологии в качестве метода терапии синдрома сухого глаза, бактериальных поражений роговицы, реабилитации пациентов после рефракционных операций (Man D., 2001; Fernandez-Barbero J. E., 2006; Alio J.L., 2007; Андреев Д.Ю., 2009).

Однако до сих пор не существует описанного опыта использования и единого алгоритма применения богатой тромбоцитами плазмы у пациентов с поражением глазной поверхности герпесвирусной этиологии. Таким образом, разработка методики ее применения у пациентов с эрозиями роговицы герпетической этиологии является принципиально новым, перспективным направлением. Все вышеизложенное позволило сформулировать цель и задачи настоящего исследования.

Цель исследования – разработать технологию лечения хронических нарушений эпителизации роговицы герпесвирусной этиологии с помощью изолированного и сочетанного применения богатой тромбоцитами плазмы и 0,01% сульфатированных гликозаминогликанов.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи исследования:**

1. Оценка частоты формирования хронических нарушений эпителизации в зависимости от характера вирусной этиологии.

2. Исследование характера и частоты встречаемости сопутствующей вторичной бактериальной инфекции у пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы герпесвирусной этиологии.

3. Анализ стерильности приготовленной богатой тромбоцитами плазмы.

4. Разработка этапной методики терапии хронических нарушений эпителизации роговицы герпесвирусной этиологии с помощью изолированного и сочетанного применения богатой тромбоцитами плазмы и 0,01% сульфатированных гликозаминогликанов.

5. Клиническая оценка терапевтического эффекта богатой тромбоцитами плазмы, изолированно и в сочетании с 0,01% сульфатированными гликозаминогликанами.

Научная новизна работы

1. Впервые проведен анализ распространенности и характера вторичной бактериальной инфекции у пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы герпесвирусной этиологии.

2. Описаны варианты клинической картины хронических нарушений эпителизации роговицы при сочетании вирусов герпеса 1, 2 типа и цитомегаловируса, а также при изолированном поражении цитомегаловирусом.

3. Впервые в экспериментальном исследовании доказаны оптимальные сроки безопасного хранения приготовленной богатой тромбоцитами плазмы.

4. Впервые проведена сравнительная оценка клинико-функциональных показателей при применении богатой тромбоцитами плазмы изолированно и в сочетании с 0,01% сульфатированными гликозаминогликанами при хронических нарушениях эпителизации роговицы герпесвирусной этиологии с доказанным равноценным эффектом в исследуемых группах.

Практическая значимость работы

1. Разработана и внедрена в клиническую практику этапная методика терапии хронических нарушений эпителизации роговицы герпесвирусной этиологии с включением в терапию богатой тромбоцитами плазмы. Также показано, что при проведении этапной терапии применение богатой тромбоцитами плазмы не приводит к реактивации герпетического процесса.

2. При сравнительном анализе использования предложенного метода, оптимальный результат заключался в получении полной эпителизации роговицы при сочетании применения богатой тромбоцитами плазмы и 0,01% сульфатированных гликозаминогликанов в 40% случаев через 4 недели терапии и в 50% случаев через 8 недель.

3. Показана стабильность полученных результатов полной эпителизации роговицы в исследуемых группах в течение 6 месяцев после окончания терапии.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Разработанная этапная технология лечения богатой тромбоцитами плазмой обеспечивает безопасную и эффективную регенерацию хронических дефектов и способствует достижению стойкой ремиссии при хронических нарушениях эпителизации роговицы герпесвирусной этиологии.

2. Показанное взаимоотношение сочетанной герпетической и цитомегаловирусной инфекции поддерживает эмпирический выбор

противовирусной терапии широкого спектра действия при начале лечения рецидивирующих хронических дефектов роговицы.

Апробация результатов работы

Результаты научно-исследовательской работы были успешно доложены и обсуждены на научных конференциях офтальмологов «Невские горизонты» (Санкт-Петербург, 2016, 2018), на Научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы офтальмологии» (Москва, 2016), на Научно-практической конференции «Федоровские чтения» (Москва, 2016), на Научном конгрессе Европейской Ассоциации зрения и исследований глаза EVER (Ницца, Франция, 2016), на 13-м Международном симпозиуме терапевтической офтальмологии и офтальмофармакологии ISOPT (Рим, Италия, 2016), на Конгрессе Европейского общества офтальмологов SOE (Барселона, Испания, 2017), на 8-м Конгрессе Европейского роговичного общества EuCornea (Лиссабон, Португалия, 2017), на XXXV Конгрессе Европейского общества катарактальных и рефракционных хирургов ESCRS (Лиссабон, Португалия, 2017), на еженедельной научно-клинической конференции ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России (Москва, 2018).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 19 печатных работ, из них – 3 в научных журналах, рецензируемых ВАК РФ. Получен 1 патент РФ на способ лечения хронических эрозий роговицы герпетической этиологии № 2653260.

Внедрение результатов работы

Основные положения работы включены в тематику лекций цикла повышения квалификации врачей-офтальмологов в ФГАУ «НМИЦ «МНТК

«Микрохирургии глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, в цикл лекций для студентов ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» МЗ РФ. Результаты проведенных исследований использованы при разработке патента на способ лечения, изложены в докладах на научно-практических конференциях, публикациях, кандидатской диссертации. Предложенные схемы лечения хронических нарушений эпителизации роговицы используются в работе отдела терапевтической офтальмологии ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

Структура и объем работы

Текст диссертации изложен на 131 странице, включает 15 таблиц и 19 рисунков. Работа состоит из введения и трех глав, включающих обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты экспериментального и клинических исследований, содержит общее заключение и выводы. Список литературы состоит из 168 источников, включающих 60 отечественных и 108 иностранных публикаций.

Экспериментальные исследования *in vitro* выполнены на базе лаборатории санитарной и клинической микробиологии головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России и ООО «Герпетический центр», г. Москва.

Клинические исследования проведены на базе отдела терапевтической офтальмологии и консультативно-диагностического отделения поликлиники и в центре фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Этиопатогенез нарушений эпителизации роговицы хронического течения

Эпителий роговицы является важнейшей структурой, обеспечивающей регулярность поверхности, прозрачность, питание роговицы, а также является барьером для инфекционных агентов и др. [47, 133, 166]. Нарушения эпителизации роговицы хронического течения характеризуются наличием полиэтиологичного затяжного воспалительного процесса в клетках эпителия и проявляются длительно существующими, торпидными к стандартной репаративной терапии нарушениями целостности эпителия роговицы. При их лечении приходится сталкиваться с непростым, поэтапным подбором адекватной терапии, трудностью достижения полного регресса заболевания. Нарушения эпителизации роговицы часто протекают с периодами короткой ремиссии и внезапными рецидивами [33, 34, 84].

В случае осложненного течения основного заболевания (кератита), исход хронического эрозивного процесса может быть самым негативным, вплоть до перфорации роговицы [84, 99, 133]. Впервые рецидивирующая эрозия роговицы была описана Hansen E. в 1872 г. как «перемежающийся невралгический везикулярный кератит» [101]. Позже, в 1874 г. Arlt von F. использовал термин «рецидивирующая эрозия роговицы» [66]. В 1900 г. Szily A. представил первое, наиболее полное описание клинической картины рецидивирующей эрозии роговицы [152]. В 1965 г. Duke-Elder W. уточнил данные о сроках появления наиболее вероятных осложнений [89].

Определенное развитие в аспектах изучения герпетических инфекций роговицы понятия «рецидивирующая эрозия роговицы» и «эпителиопатия» получили в работах Майчука Ю.Ф. и Каспарова А.А. [17, 18, 35]. Авторы впервые в отечественной литературе указали на возможную этиологическую

роль герпетических вирусов в нарушении трофики эпителиальных клеток роговицы. Кроме вышерассмотренных причин, картина рецидивирующего эрозирования поверхности роговицы может быть результатом перенесенного хирургического вмешательства, травмы роговицы, кератоконъюнктивитов бактериальной или вирусной этиологии [99, 124].

В зарубежной литературе принят термин «persistent epithelial defect», отражающий наличие постоянно существующих, несмотря на активно проводимую репаративную терапию, дефектов эпителия самой различной этиологии [93, 125]. При этом Fukuda M. с соавт. (2008) и Gumus K. с соавт. (2010) используют данный термин в дискуссиях о тактике обследования и ведения пациентов с герпетической инфекцией роговицы [96, 100].

1.1.1. Вероятная этиологическая роль герпетической инфекции в формировании хронических нарушений эпителизации роговицы

В доступной литературе лишь единичные источники приводят данные в отношении детекции генетического материала герпесвирусов у пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы [96]. В этом отношении достаточно примечательны данные Fukuda M. с соавт. (2008), которые различают три отдельных термина: «герпетический эпителиальный кератит», «герпетический стромальный кератит» и уже упомянутый выше зарубежный термин «персистирующий эпителиальный дефект». Авторы выявили ДНК вируса простого герпеса (ВПГ) в слезной жидкости в достаточно высоком проценте случаев при поражении эпителия, причем максимальное количество вируса обнаружено именно при наличии так называемого «персистирующего эпителиального дефекта» – до 88,9% случаев. Каспарова Е.А. с соавт. (2010) отмечает, что среди причин возникновения хронических нарушений эпителизации роговицы до 53% случаев приходится на герпетическую инфекцию, вызваемую ВПГ 1 и 2 типов [21].

Несмотря на то, что к настоящему моменту известно 8 представителей семейства герпетических вирусов, патогенных для человека, в доступной офтальмологической литературе, в основном, упоминаются три герпетических вируса: вирусы простого герпеса первого и второго типов (ВПГ-1 и ВПГ-2) в качестве этиологических факторов развития герпетических кератитов, а также цитомегаловирус (ЦМВ) как этиологический агент специфического ретинита [15, 18, 29, 40, 81]. В этиопатогенезе поражения эпителия роговицы большое значение имеют биологические свойства вышеуказанных вирусов. ВПГ 1 и 2 типов – ДНК-вирусы, характеризующиеся эпителиотропностью – с одной стороны и способностью находиться в латентном состоянии в нервных ганглиях с другой стороны [23, 58]. В фундаментальных работах, касающихся особенностей взаимодействия вирусов с клетками подчеркивается способность вирусов группы герпеса задерживать деление клеток, что может иметь существенное влияние на замедление или остановку процесса эпителизации после перенесенного герпетического кератита [41, 53].

К биологическим особенностям цитомегаловируса следует отнести наличие более крупного ДНК-генома (диаметр нуклеокапсида составляет 100-120 нм) и более медленную репликацию вируса. При этом репликация вируса возможна без повреждения клеток [23, 28]. ЦМВ представляет собой герпесвирус, инфицирование которым происходит от человека человеку через основное место его персистенции – секрет слюнных желез. Первоначальное инфицирование ЦМВ может происходить в бессимптомной форме или в виде мононуклеозоподобного синдрома. Доля людей, имеющих антитела к ЦМВ составляет в мировом масштабе от 45% в развитых странах до 100% в развивающихся регионах – Африке, Южной Америке, Азии [28, 58]. Существенным малоизвестным фактом является способность ЦМВ поражать не только клетки сетчатки, но и эпителий конъюнктивы и роговицы [25, 118, 167]. Кроме того, Кицак В.Я. указывает на значительную роль ЦМВ-инфекции в развитии вторичного иммунодефицита: в частности, клинические

изменения клеточного состава крови характеризуются лимфоцитозом, нейтропенией, тромбоцитопенией, панцитопенией, снижением количества и функциональной активности Т-лимфоцитов. При активизации ЦМВ-инфекции выявляют снижение уровней сывороточного интерферона, подавление способности лейкоцитов к выработке альфа- и гамма-интерферонов, а также существенные метаболические нарушения в сыворотке крови и тканях [24]. Последний факт может иметь существенное значение при хронических нарушениях эпителизации роговицы при сочетанном инфицировании вирусами простого герпеса и цитомегаловирусом.

После широкого внедрения метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в практику изучения наличия генетического материала герпетических вирусов в ткани роговицы (в том числе, в роговице доноров и реципиентов), было опубликовано большое количество работ, посвященных обсуждению результатов данных исследований. Так, в 2000 г. в исследовании Van Gelderen В.Е. с соавт., посвященном выявлению ДНК ВПГ 1, 2 типов на 31 роговице пациентов, идущих на пересадку, было доказано наличие ВПГ 1 типа в 10 образцах (32% случаев), ВПГ 2 типа – в 1 образце (3% случаев). Полученные данные ПЦР-диагностики 78 доноров показали наличие ВПГ 1 типа в 13 образцах (17% случаев). Представленные результаты доказывают возможность вовлечения ВПГ 1,2-инфекции во время трансплантации роговицы без предшествующих клинических признаков герпетического кератита [98, 160].

Позже, в 2003 г., у 38 пациентов, идущих на пересадку роговицы, выявление ВПГ 1 типа с помощью ПЦР было доказано в исследовании Robert P.Y. с соавт. Представленные результаты подтвердили предыдущие наблюдения [137].

В 2007 г. Shimomura Y. с соавт. продолжили работу, посвященную выявлению ВПГ в роговице пациентов, идущих на сквозную кератопластику. Анализ наличия ВПГ производился на 44 образцах материала, включавших

37 образцов без истории герпетического кератита и 7 с его наличием в анамнезе. Среди образцов с наличием в анамнезе герпетического кератита было выявлено высокое содержание ДНК ВПГ 1 типа. Ценность, подтверждавшую предыдущие исследования, имел факт обнаружения ВПГ 1 типа в 4 образцах из 37 без данных анамнеза герпетического кератита (10,8% случаев). Таким образом, использование ПЦР оказалось высокоэффективным методом, в том числе для выявления ВПГ в условиях латентного течения инфекции [147].

В 2012 г. Wang J. с соавт. исследовали образцы роговицы пациентов, идущих на пересадку, полученные при проведении передней глубокой послойной кератопластики после перенесенного герпетического кератита. Иммуногистохимический метод показал наличие антигенов вируса простого герпеса во всех 43 образцах. Всем пациентам, включенным в исследование, проводили внутривенные инъекции раствора ацикловира перед хирургическим вмешательством, что позволило добиться лучшего приживления трансплантата. Срок наблюдения составил 4 года. На фоне предложенной методики отторжение трансплантата наблюдалось лишь в 1 случае. Результат длительного динамического наблюдения 42 пациентов показал абсолютную прозрачность роговичного трансплантата в течение 4 лет на фоне проведенной системной противовирусной терапии [162].

Полученные данные свидетельствуют о существенном значении наличия ВПГ в ткани роговицы и необходимости проведения специфической противовирусной терапии с целью нивелирования активации герпетического процесса.

1.1.2. Характерные клинические проявления и морфологические особенности герпесвирусных хронических нарушений эпителизации роговицы

Возникновение хронических нарушений эпителизации роговицы может быть связано с травмой, инфекцией, дистрофией роговицы, эндокринными

нарушениями и наследственными заболеваниями. Основой механизма возникновения хронических нарушений эпителизации роговицы при той или иной этиологии заболевания является нарушение адгезии эпителия роговицы к Боуеновой мембране [70, 71, 95].

Клиническая картина хронических нарушений эпителизации роговицы представлена ярко выраженным роговичным синдромом: возникает резкая боль в глазу (наиболее часто характерна утренняя боль сразу после того, как пациент откроет глаза), чувство инородного тела, покраснение, слезотечение и светобоязнь.

При биомикроскопии у пациентов наблюдаются смешанная инъекция глазного яблока, разрыхленность и приподнятость эпителия или его локальное отсутствие, наличие эпителиальных микрокист либо эпителиального дефекта роговицы. Также могут визуализироваться стромальные инфильтраты и помутнения [47, 74, 139].

Участки разрыхленного эпителия являются наиболее постоянным признаком хронических нарушений эпителизации роговицы. Вследствие адгезии века к эпителию в ночное время происходит разрыв поверхностного слоя эпителия.

По данным Fukuda M., Deai T., Higaki S. с соавт. (2008) наиболее частая локализация поражения – нижняя парацентральная зона (68,4%), в верхней зоне роговицы эрозия располагается в 21,3% случаев, в 27,3% – локализация обширная [96].

К предрасполагающим факторам развития хронических нарушений эпителизации относят гистологические особенности роговицы: отсутствие в норме сосудистой сети, лимфатических сосудов, что затрудняет контроль со стороны иммунной системы и понижает противовирусную защиту [18, 40, 103, 110].

В настоящее время в литературе имеются данные о том, что нейроны чувствительных ганглиев используются ВПГ как место пребывания и как транспортная система [54, 93].

Наличие высокой плотности нервных окончаний в слоях роговицы является фактором предпосылки для накопления вирусных частиц, что провоцирует развитие герпетического кератита [97, 130, 134].

На сегодняшний день ВПГ лидирует как этиологический фактор развития нарушений эпителизации роговицы. По данным, опубликованным на основании отчетов ВОЗ, ежегодно в мире диагностируется около 1,5 млн. новых случаев кератита, обусловленных ВПГ [124].

Наиболее часто встречающейся формой поражения роговичного эпителия является «древовидный» кератит, который может быть вызван как собственно ВПГ 1, 2 типов, так и вирусом *V. Zoster*. Считается, что данная патология формируется путем слияния очагов поражения и обусловлена дихотомическим делением роговичных нервов [18, 25, 58].

Tabery H. (2009) опубликовал исследования, в которых было показано выявление диффузии сквозь зоны нарушения эпителизации к строме при использовании раствора флуоресцеина натрия. Таким образом, можно сделать вывод о том, что даже при поверхностном поражении идет активное вовлечение глубже лежащих слоев роговицы [151, 153]. Этим может быть объяснена длительность течения на первый взгляд легких нарушений эпителизации роговицы [58].

Основным цитомегаловирусным поражением, встречающимся в офтальмологии, считается ЦМВ-ретинит у иммунокомпрометированных лиц. Однако к настоящему времени опубликованы сообщения, описывающие поражение этим вирусом эндотелия роговицы [39, 72, 118, 126, 128].

ЦМВ-эндотелиит впервые описал Sundmacher R. в 1981 году у новорожденного с внутриутробной инфекцией, вызванной ЦМВ [150]. Клинические признаки ЦМВ-эндотелиита: отек роговицы, преимущественно в задних отделах, формирование «монетовидных» роговичных преципитатов, в части случаев – передний увеит, офтальмогипертензия. При отсутствии положительной динамики от применения при увеальном процессе

глюкокортикостероидов, повышается вероятность роли ЦМВ [61, 148, 164, 165].

Однако клиническую картину с характерными преципитатами на эндотелии не представляется возможным отнести к признакам поражения именно ЦМВ, так как данный симптомокомплекс также наблюдается при инфекции вирусами простого герпеса, V. Zoster и эпидемического паротита [105, 114].

Кричевская Г.И. с соавт. (2000) исследовали роль активной ЦМВ-инфекции при воспалительной патологии у взрослых и детей. В группе взрослых в 18% случаев серологическими методами была подтверждена реактивация ЦМВ-инфекции, причем в трети случаев отмечалась заинтересованность роговицы [28].

Еще одной возможной формой поражения эпителия роговицы при наличии ЦМВ-инфекции является кератит Тайджесона. Отсутствует доказанная связь заболевания с системной патологией. Кроме того, доказано отсутствие взаимосвязи заболевания с ВПГ 1, 2 типов, а также с вирусом V. Zoster. За годы исследований несколько раз в литературе публиковались подтверждения гипотетической связи заболевания с ЦМВ-инфицированием, однако прямых доказательств найдено не было [154].

В работах Майчука Ю.Ф. (1981) в отдельную группу выделена постгерпетическая кератопатия, проявляющаяся в виде двух клинических форм: эпителиопатии и буллезной кератопатии. Возникает, как правило, на фоне выраженного повреждающего действия герпетической инфекции при тяжелых кератитах [35].

Значительная роль в процессе репарации эпителия роговицы принадлежит базальной мембране. В случае сохранения ее целостности процесс эпителизации роговицы происходит быстрее, чем при наличии ее существенного дефекта. При вовлеченности в патологический процесс базальной мембраны изначально происходит ее новое построение с участием эпителиальных клеток, что снижает общую скорость регенерации.

Впоследствии возможно формирование микрокист и образование микрокистозной дистрофии роговицы, при которой кисты могут иметь тенденцию к миграции в поверхностные слои роговицы, что способствует рецидиву эрозивного процесса. Это было показано еще в работах Cogan D., Donaldson D. с соавт. в 1964 году [77].

В 1968 г. в исследованиях Khodadoust A., Silverstein A. с соавт. была показана роль фермента коллагеназы, выделяющегося при возникновении нарушения эпителизации роговицы. Коллагеназа влияет на деление клеток, возникающее при закрытии дефекта эпителия, а также на разрушение соединений новых эпителиальных клеток с подлежащей базальной мембраной [113].

В качестве дополнительного метода для изучения причин возникновения рецидивирующих эрозий роговицы в 1969 г. была использована электронная микроскопия. В ходе применения данного метода удалось выявить в качестве основных признаков развития рецидивирующей эрозии роговицы наличие прерывистости базальной мембраны, а также нарушение формирования новой базальной мембраны из клеток эпителия, формирующихся в месте эрозии. Также отмечалось наличие менее плотных межклеточных промежутков и изменение клеточных органелл (расширение эндоплазматического ретикулума, отечность митохондрий с изменениями кистозного характера). При наличии рецидивирующих эрозий роговицы обращало на себя внимание значительно меньшее количество клеточных соединений с базальной мембраной, имевшей в некоторых случаях варьирующую толщину (50-100 нм) [99, 157].

Использование метода световой микроскопии в работах Bron A. с соавт. (1972) показало наличие эпителиальных клеток неправильной формы, с гладкими контурами, а также интра- и экстрацеллюлярный отек эпителия. При проведении микроскопии в верхних слоях эпителия визуализировались интраэпителиальные кисты овальной формы, часть которых открывалась

наружу. Базальная мембрана в этих зонах плохо или вовсе не прилегала к эпителию [74, 157].

Благодаря данным фактам морфологических изменений (отсутствие соединений между эпителием и базальной мембраной) можно объяснить визуализируемые при биомикроскопии шероховатости и приподнятости эпителия роговицы.

1.2. Методы диагностики хронических нарушений эпителизации роговицы герпесвирусной этиологии

Метод флюоресцирующих антител

Одним из наиболее быстрых и специфичных методов диагностики герпесвирусных заболеваний глаз по данным Kaufman H.E. (1962) и Pettit T.H. (1981) являлся метод флюоресцирующих антител (МФА). Материалом для исследования служили соскобы с конъюнктивы и эпителия роговицы [35, 107].

По данным исследований, проведенных Каспаровым А.А. (1972) и Зайцевой Н.С. (1975), антиген ВПГ обнаруживался в соскобах эпителия конъюнктивы и роговицы при поверхностных формах поражения у 39-81%, при глубоких формах – у 40-63% пациентов [12, 16].

Kaufman H. (1978) в своих исследованиях показал возможность применения МФА в диагностике герпесвирусных иридоциклитов [108].

Зайцева Н.С. (1975) и Кричевская Г.И. с соавт. (2000) показали, что даже после наступления выздоровления, возможно наличие специфического свечения у 11-45% пациентов, которое может определяться и в клинически здоровом глазу, чего никогда не бывает при заболеваниях не герпесвирусной этиологии [13, 28].

Однако получение материала для проведения МФА связано с проведением соскоба с пораженной конъюнктивы или роговицы, что приводит к дополнительной травме эпителия, а кроме того, применение

анестетиков, используемых при заборе материала, может оказывать дополнительное токсическое действие. Также, при переходе заболевания в подострую или хроническую формы значительно уменьшается ценность данного метода.

Реакция непрямой гемагглютинации

В 1979 г. Майчук Ю.Ф. с соавт. разработали метод диагностики офтальмогерпеса с помощью исследования слезной жидкости на наличие антигена ВПГ с использованием реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) [35]. Забор материала производился без предварительной анестезии, использовалась слеза в объеме одной капли, с последующим разведением в 0,5 мл физиологического раствора.

Для постановки РНГА использовался герпетический гама-глобулиновый эритроцитарный диагностикум. Помимо стандартных для серологических реакций контролей: контроля эритроцитов, исходного материала на агглютинацию эритроцитов, при РНГА использовался дополнительный контроль на специфичность агглютинации. Это достигалось путем введения в реакцию специфической противогерпетической сыворотки.

По данным проведенных сравнительных исследований, герпетическая этиология заболевания была подтверждена у 56% пациентов с поверхностными формами офтальмогерпеса, в отличие от реакции иммунофлюоресценции у этих же пациентов, показавшей положительный результат лишь в 20% случаев. При наличии глубоких поражений офтальмогерпесом РНГА позволяла выявить ВПГ в 73% случаев [35].

Метод выделения вируса в культуре клеток

С целью определения герпесвирусной этиологии также может быть использован метод выделения вируса. Ведущим фактором в определении результата данного исследования является глубина поражения роговицы. Наиболее часто можно выделить вирус при поверхностной патологии. Для

проведения исследования используется соскоб конъюнктивы или роговицы, что может способствовать дополнительной травматизации тканей [35].

Цитологический метод

Представляет собой исследование фиксированных и окрашенных соскобов конъюнктивы и роговицы. Среди характерных для герпесвирусного процесса изменений отмечается: разрыхленность эпителия, дегенерация ядер в виде полиморфной вакуолизации, образование ядерных включений, также может наблюдаться появление многоядерных клеток, лимфоидная реакция с наличием средних и больших лимфоцитов, плазматических клеток и моноцитов [35, 36].

Метод электронной микроскопии

В 1972 г. как быстрый метод диагностики Kobayashi S. была предложена электронная микроскопия, а в 1976 г. Kajima M. с соавт. провели ряд исследований, подтвердивших эффективность электронной микроскопии, после чего метод был предложен в качестве диагностического в оценке герпесвирусных заболеваний роговицы [цит. по 35, 39].

Иммуноферментный анализ крови

Чувствительность иммуноферментного анализа крови (ИФА) при исследовании антител к ВПГ 1 типа составляет 91-96%, специфичность – 92-95%. Для ВПГ 2 типа чувствительность укладывается в 97-100% и специфичность 94-98% [84].

Исследование включает определение антител Ig G, М к ВПГ. Антитела Ig М являются показателем острой инфекции и появляются в среднем на 2-3-й неделе от начала заболевания. По данным Кишкун А.А. (2006), пик титров отмечается на 4-6-й неделе с момента развития клинической картины заболевания и снижается через 2-3 месяца после перенесенной инфекции.

При повторном инфицировании, как правило, не происходит существенного изменения Ig M.

До 80-90% лиц старше 40 лет имеют антитела Ig G к ВПГ-1, 2, при реактивации инфекции отмечается нарастание титров Ig G [23].

Антитела Ig M к ЦМВ, как правило, появляются через 1-2 недели от начала заболевания. Антитела Ig G к ЦМВ появляются в среднем через 2-4 недели после заражения и могут сохраняться в крови до 10 лет. О реактивации инфекции может говорить 4-кратное увеличение титров Ig G.

В 1989 г. Hedman К.М. с соавт. предложили выявление avidности антител Ig G к ЦМВ как индикатор определения срока первичного заражения [23].

Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является методом определения ДНК (РНК) вирусов. Клерре с соавт. в 1971 г. впервые описал основные принципы ПЦР и состав реакционной смеси для получения копий ДНК [48]. Однако на тот момент не было продемонстрировано ключевой особенности ПЦР – увеличения количества копий фрагмента исходной ДНК.

Метод полимеразной цепной реакции был предложен в 1983 г. и заключается в многократном копировании *in vitro* сравнительно коротких, двухцепочечных фрагментов ДНК. Основой реакции является механизм, реализованный вследствие внутриклеточной репликации молекул ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы.

Материалом для исследования может служить соскоб с конъюнктивы или роговицы. Метод является высокочувствительным и может быть использован для определения вирусов при остром или хроническом течении заболевания [65, 111, 136].

Метод цитопатического эффекта

Под термином цитопатический эффект подразумевают изменения, происходящие в клеточных структурах, непосредственно связанные с внутриклеточным размножением цитопатогенных вирусов. Основным морфологическим проявлением цитопатогенного эффекта вируса на клетки является дезинтегративное набухание ядер клеток. Данный феномен может использоваться в качестве выявления в культурах клеток хронической вирусной инфекции. Другим проявлением являются цитохимически выявляемые изменения метаболизма клеток. В процессе цитохимической обработки материала исследования выявляются изменения нуклеинового, нормального белкового и углеводного обмена. Изменения обмена веществ возникают как защитная реакция клеток, а также являются следствием деструктивных изменений в клетках на фоне цитопатического эффекта.

Данный метод исследования проводится на стандартной культуре клеток эпителия почек обезьяны и в настоящий момент является «золотым» стандартом определения наличия реплицируемого вирусного материала.

Выделяют несколько форм развития цитопатического эффекта: равномерная мелкозернистая деструкция клеток, очаговая мелкозернистая деструкция, гроздевидные скопления пораженных клеток и равномерная крупнозернистая деструкция клеток. Последняя характерна для положительного результата исследования при герпетической инфекции [53, 164].

1.3. Методы консервативного лечения хронических нарушений эпителизации роговицы герпесвирусной этиологии

Последние десятилетия сформировали три основных подхода в консервативном лечении пациентов с герпетическими кератитами и возникающими как их следствие хроническими нарушениями эпителизации роговицы. С этой целью используются специфическая противовирусная

терапия, включающая применение индукторов интерферона и иммуномодуляторы, применение специфических противогерпетических препаратов, а также различных репаративных препаратов.

Если клиническая картина кератита определяется размножением герпесвирусов, то в течение нескольких суток специфической терапии противовирусными препаратами следует ожидать положительной динамики [31, 78, 79, 80].

1.3.1. Специфическая противовирусная терапия

Препараты группы интерферонов

Интерфероны α , β , γ представляют собой цитокины, регулирующие рост, размножение и дифференцировку клеток, это определяет их роль как значимых факторов гомеостаза и резистентности организма. Противовирусные свойства выражены у α - и β -интерферона, а иммунорегуляторные и антипролиферативные наиболее выражены у γ -интерферона.

В 1981 году в ходе проведенных Соловьевым В.Д. исследований, была доказана биологическая активность интерферонов в отношении практически всех ДНК- и РНК-содержащих вирусов [52]. Кроме того, показано, что после удаления интерферона в обработанных клетках сохраняется способность к подавлению размножения вирусов. Противомикробное действие препаратов интерферона обусловлено наличием в препаратах антибактериальных пептидов [9, 10, 30, 37, 46].

Офтальмоферон является многокомпонентным препаратом, содержащим интерферон, и используемым в офтальмологии. Другими составляющими являются димедрол, борная кислота и поливинилпирролидон. За счет димедрола достигается антигистаминный и противоотечный эффекты, что является важным при купировании острых

форм вирусной инфекции, сопровождающихся явлениями токсико-аллергических реакций. Борная кислота с одной стороны является консервантом для глазных капель, с другой – обладает определенным антисептическим действием. Это довольно значимый момент, т.к. при развитии вирусного поражения часто идет присоединение вторичной бактериальной инфекции. Наличие в составе поливинилпирролидона выполняет роль искусственной слезы и пролонгирует действие активных веществ препарата. Ряд исследований, проведенных *in vitro* и *in vivo*, показали, что поливинилпирролидон участвует в выработке собственного интерферона, это свойство характерно в том числе для пациентов с герпесом [6, 35, 38].

Исследования, проведенные на кроликах породы шиншилла на модели острого экспериментального офтальмогерпеса, показали, что инстилляцией Офтальмоферона статистически достоверно сокращают сроки эпителизации роговицы. Значительным фактом оказываются данные об отсутствии токсико-аллергических реакций при применении препарата [38, 59, 60].

Использование иммуномодулирующей терапии

Иммуномодулирующие препараты: Тималин, Тактивин, Левамизол, Ликопид, Нуклеинат натрия показали положительный эффект в составе комплексной терапии герпетических кератитов [9]. Описан положительный опыт использования раствора Пирогенала для лечения герпес-вирусных кератитов. Однако наибольшее количество исследований относительно лечения герпетических кератитов с помощью иммуномодуляторов в настоящее время принадлежит исследованиям эффективности применения препарата Полудан. Возможно его применение в инстилляциях, а также субконъюнктивальных и парабульбарных инъекциях, позволяющих по данным Каспарова А.А. с соавт. (1994) получить выраженный терапевтический эффект в 50-60% случаев [16, 18]. Также в исследованиях

Краснова М.М. (1997) сообщалось о 70% эффективности применения Полудана в комбинации с Ацикловиром в лечении герпетических кератоувеитов [27, 32].

Ковальчук Л.В., Павлюк А.С. с соавт. (1999) провели исследования, показавшие, что введение Полудана оказывало влияние на значительное усиление активности естественных киллеров, сниженных при офтальмогерпесе. В 1999 г. в исследованиях Митягиной О.Н. и Павлюк А.С. было показано антиапоптозное влияние Полудана на культуру лимфоцитов [17, 42].

Иммунологические исследования, проведенные *in vitro* показали, что препарат участвует в стимулировании как естественной цитотоксичности, так и влияет на другие иммунокомпетентные клетки, в регуляции активности которых значительная роль принадлежит интерферону [18, 27].

Следующим этапом была разработана экспресс-аутоцитокиноterapia, метод применения Полудана в комбинации с аутокровью больного. Данная методика увеличила эффективность лечения при тяжелых формах герпес-вирусного кератоиридоциклита, сопровождающегося нарушениями эпителизации роговицы [19, 20].

1.3.2. Специфическая противогерпетическая терапия

Аналоги нуклеозидов представляют собой вещества, имеющие химическое сходство с естественными нуклеозидными основаниями. Это способствует их быстрому проникновению сквозь мембраны клеток. Затем, внутри поврежденной клетки аналог нуклеозида превращается в активное вещество (трифосфат), которое блокирует синтез вируса. При этом для здоровой клетки роговицы аналог нуклеозида является нейтральным, вследствие того, что образование активной формы протекает с участием ферментативной системы вируса [110].

Первые шаги научно обоснованного применения химиотерапии для лечения вирусных инфекций в офтальмологии произошли во второй половине XX века. В 1962 г. Kaufman H. предложил использование идоксуридина для лечения заболеваний глаз герпетической этиологии, однако в 1974 г. в работах Krejci L., Kreicova H. было установлено, что он оказывает цитотоксическое действие на культуру тканей эпителия роговицы, при этом в ходе проведения экспериментальных исследований, полная деструкция клеток эпителия роговицы наблюдалась в 2 раза быстрее, чем в группе с преднизолоном. В 1973-1975 гг. в работах Kaneco M., Abel R. с соавт. был доказан высокий риск развития резистентности при его использовании [35, 107, 110].

Актуальным является использование специфических препаратов, направленных на подавление герпетической инфекции.

Одним из наиболее известных соединений – аналогов природных нуклеозидов с противовирусной активностью является ацикловир – 9-[(2-гидроксиэтокси) метил] гуанин.

В 1983 г. Shaeffer H.J. показал, что действующее вещество препарата обладает избирательностью действия в отношении инфицированных вирусом простого герпеса клеток [67-69].

Наибольшей чувствительностью к препарату обладают вирусы простого герпеса 1 и 2 типов, в меньшей степени препарат воздействует на V. Zoster. Цитомегаловирус практически не чувствителен к воздействию ацикловира. Возможно использование препарата в системной форме, а также местное применение в виде глазной мази.

Из отрицательных моментов стоит отметить токсичность препарата при его длительном местном применении, вследствие чего не рекомендовано его назначение в терапии более 7-10 дней [82, 90].

Другим препаратом является 0,15% Ганцикловир, представляющий собой гелевую лекарственную форму, в которой сочетаются высокая проникающая способность, низкая токсичность и высокая противовирусная

активность (препарат подавляет размножение всех герпесвирусов, имеющих влияние на ткани глаза: ВПГ-1, 2, ВВЗ, ЦМВ, ВЭБ, ГВЧ-6 и ГВЧ-7). Высокая проникающая способность 0,15% Ганцикловира обуславливается его гелевой формулой, в сравнении с препаратами на мазевой основе (3% Ацикловир), гелевые лучше проникают к пораженным кератоцитам [78-80]. Многочисленными исследованиями показано, что 0,15% Ганцикловир превышает среднюю эффективную дозу для вирусов группы Герпеса (под эффективной дозой понимают количество вещества, необходимого для подавления 50% вирусной популяции). Низкая токсичность и хорошая переносимость препарата также обусловлены его гелевой формулой. Высокая проникающая способность позволяет использовать действующее вещество в меньшей концентрации, что снижает риск возникновения токсических кератопатий. У пациентов намного реже возникают жалобы на затуманенность зрения, жжение, дискомфорт. Осмолярность и pH 0,15% Ганцикловира сходны с показателями слезы, это обеспечивает хорошую переносимость гелевого раствора при воспалении на глазной поверхности. Местное применение глазного геля 0,15% Ганцикловира практически не оказывает системного воздействия [109, 140, 141].

1.3.3. Слезозаместительная и репаративная терапия

Стандартом лечения хронических нарушений эпителизации роговицы является применение слезозаместительной и репаративной терапии препаратами различной степени вязкости.

С целью устранения нарушения эпителизации роговицы, актуальным является применение стимуляторов регенерации и трофики роговицы: Корнерегель, Солкосерил, Актовегин, 0,01% Баларпан, Вит-А-ПОС. 5% Декспантенол, содержащийся в составе Корнерегеля, стимулирует выработку коэнзима А, а также обладает способностью связывать воду в эпителиальных клетках роговицы [58].

Применение дериватов крови молочных телят (Солкосерил и Актовегин) способствует регенерации поврежденной роговицы [7], а наличие витамина А в составе препарата Вит-А-ПОС приводит к ускорению процессов роста и дифференцировки эпителиальных клеток. Однако повышенное содержание витамина А может являться фактором развития токсико-аллергических реакций [49].

Значительную роль при наличии дефектов эпителия роговицы играет сопутствующий синдром сухого глаза. В комплексной терапии лечения хронических нарушений эпителизации роговицы слезозаместительная терапия используются как симптоматическая, с целью снижения выраженности жалоб пациента, таких как сухость, жжение, раздражение, чувство дискомфорта и инородного тела [85].

Lambiase A. с соавт. (2016) провели исследования, согласно которым наличие консерванта в препарате способствует токсическому действию на эпителий роговицы, изменению его структуры, снижая при этом репаративные процессы. Исходя из вышесказанного, в настоящий момент стараются отдавать предпочтение бесконсервантным формам слезозаместителей. Одним из оптимальных активных компонентов, часто используемых в качестве слезозаместительной терапии, является гиалуроновая кислота, по структуре представляющая собой молекулярную губку. Цепь гиалуроновой кислоты, сжимаясь и расправляясь, увлажняет глазную поверхность, участвуя при этом в репаративных процессах роговицы [58, 121].

Несмотря на большое разнообразие, абсолютно все слезозаместители требуют необходимости частых инстилляций, способствуя при этом лишь временному купированию симптомов раздражения глаз, более вязкие формы препаратов при этом нередко вызывают ощущение затуманенного зрения [103].

Роль сульфатированных гликозаминогликанов в лечении хронических нарушений эпителизации роговицы

Изучение протеогликанов ведется с начала 20-го столетия, с открытия белка «хондромукоида» в хрящевой ткани и производстве первого антикоагулянта – гепарина. Активно изучались гиалуроновая кислота, кератан сульфат, изомеры хондроитина сульфата, гепарина – все они были объединены в группу гликозаминогликанов (ГАГ) [161].

Сульфатированные гликозаминогликаны (сГАГ) представляют собой неразветвленные полисахаридные цепи, состоящие из повторяющихся дисахаридных единиц, одна из которых является аминсахаром, в большинстве случаев сульфатированным, а другая – уроновой кислотой. За счет степени сульфатированности и молекулярной массы различаются их физико-химические свойства, наибольшую величину имеют молекулы гиалуроновой кислоты. К сГАГ относятся хондроитин-4,6-сульфаты (ХС), кератансульфаты (КС), дерматансульфаты, гепарин, гепарансульфат [4].

В ходе проведения ряда научных исследований удалось выделить функции сГАГ:

1) трофическая – регуляция транспорта воды, солей, аминокислот, липидов, метаболитов в бессосудистых брандитрофных тканях;

2) структурная – сГАГ участвуют в организации экстрацеллюлярного матрикса, играют роль в процессе связывания коллагена I и II типа, обеспечивают правильную укладку тропоколлагена в фибриллах и фибрилл в волокнах коллагена, способствуя специфической структурной организации ткани. В комплексе с коллагеном, эластином и неколлагеновыми белками они определяют такие свойства роговицы, как прочность и эластичность, образуя связь между поверхностью клетки и межклеточным веществом;

3) регуляторная – благодаря своей полианионной структуре, сГАГ принимают активное участие как в физиологических, так и в патологических процессах, меняют конформацию различных молекул, регулируют степень активности и продукции цитокинов, созревание лейкоцитов и других клеток

воспалительного ряда. Наиболее важным свойством сГАГ считается их способность к подавлению действия клеточных ферментов. Это происходит вследствие связывания с их активными центрами и изменения конформации, способности к пространственному распределению цитокинов и клеточных ферментов в тканях. При нарушении целостности ткани происходит синтез свободных сГАГ, воздействующих на начальные этапы воспалительного процесса [43, 50].

В определенной степени сГАГ обладают способностью связывать продукты распада и образующиеся свободные кислородные радикалы, что снижает активность медиаторов воспаления, количество макрофагов в очаге. Происходит регрессирование воспалительной реакции ткани в ответ на повреждение. В литературе имеются данные о способности сГАГ блокировать антигенные детерминанты, препятствуя развитию иммунных и аутоиммунных процессов [2, 129, 142].

В 1981 году Серов В.В., Шехтер А.Б. опубликовали результаты исследований, согласно которым введенные экзогенным путем в очаг повреждения сГАГ образуют временный матрикс, который воздействует на переключение фибробласта от синтеза кислых гликозаминогликанов к тропоколлагену. Молекулы тропоколлагена замыкают водородные и ковалентные связи, объединяются в протофибриллы. Сульфатированные ГАГ связывают протофибриллы в фибриллы, определяют их длину, диаметр, ориентацию, и организуют фибриллы в волокна коллагена. Следовательно, экзогенно введенные в зону повреждения сГАГ стимулируют репаративные процессы в роговице, тем самым ускоряют заживление, а также снижают воспалительную реакцию [50].

Кроме того, после перенесенных рефракционных операций, пересадок роговицы, кератитов, эрозий и других повреждений, применение сГАГ позволяет достичь максимальной прозрачности роговицы при заживлении, без избыточного рубцевания [50].

Биомодальный эффект сГАГ проявляется в зависимости от их концентрации. Так, препараты, содержащие в составе гликозаминогликаны с концентрацией 0,1-0,5% обладают способностью стимулировать культуру фибробластов, в то время как препараты с концентрацией 1-5% подавляют их пролиферацию [55].

В экспериментальных исследованиях Терещенко А.В. с соавт. (2016) было доказано, что при в условиях токсического воздействия на эпителий роговицы, инстилляцией 0,5% раствора сГАГ быстрее приводят к эпителизации и восстановлению прозрачности роговицы вследствие выраженных протекторных свойств препарата [56].

В настоящий момент в практике активно используется препарат на основе сульфатированных гликозаминогликанов Баларпан, действующим веществом которого является смесь хондроитин-4,6-сульфата и кератансульфата. Комплекс активных веществ сочетает в себе репаративные и противовоспалительные свойства. Входящие в состав препарата сГАГ получены из прозрачной стромы роговицы свиней, ткани которых наибольшим образом близки по генетическим характеристикам к тканям человека. Соотношение действующих веществ в полученном препарате (хондроитин-4,6-сульфат и кератансульфат) соответствует их наличию в строме роговицы. Данная смесь сГАГ обладает способностью эффективно воздействовать на поврежденную роговицу, за счет ее значительной роли в образовании комплекса с белковыми макромолекулами в местах их синтеза.

Еще одним препаратом, обладающим функцией репарации роговицы и содержащим в своем составе сГАГ, является 0,3% Оквис. В основе препарата лежит гидроксиэтилцеллюлоза с добавлением хондроитин-4-сульфата, выделенного из хрящей трахеи быка [2, 4].

В 2007 г. Анисимовым С.И. были проведены экспериментально-морфологические исследования, показавшие положительный эффект применения препарата. Производилось нанесение радиальных несквозных надрезов на роговицу кроликов и последующие инстилляцией 0,3% Оквиса в

течение 7 дней. По окончании эксперимента проведенные гистологические исследования показали, что в исследуемой группе базальная мембрана в зоне надреза роговицы представляла собой тонкую очерченную линию, тогда как в группе контроля она имела неровный, фрагментарный характер, в некоторых образцах материала визуализировались разрывы стромы роговицы [2, 3].

1.3.4. Профилактика вторичной бактериальной инфекции

Несмотря на наличие в составе противовирусных препаратов компонентов, в определенной степени обеспечивающих антибактериальный эффект (борная кислота и интерферон), при вероятности наличия вторичной бактериальной инфекции возникает необходимость проведения ее профилактики или лечения. С этой целью в настоящее время в клинической практике активно используются препараты группы аминогликозидов и фторхинолонового ряда [36, 123]. Антибактериальные препараты фторхинолонового ряда 3 и 4 поколения (Левифлоксацин, Моксифлоксацин) обладают рядом преимуществ: быстрое проникновение в очаг воспаления, быстрое достижение ингибирующих концентраций для возбудителей, эффективность и скорейшее уничтожение бактерий, минимальное распространение инфекции, минимизация возникновения резистентных бактерий [122, 163].

Применительно к хроническим нарушениям эпителизации роговицы герпетической этиологии, в настоящий момент отсутствуют данные о вероятности развития вторичной бактериальной инфекции, что обусловило необходимость одной из представленных в настоящей работе задач.

1.3.5. Роль нестероидных противовоспалительных препаратов

В период обострения герпетического процесса, сопровождающегося нарушением эпителизации роговицы, применение глюкокортикостероидов

нежелательно, так как местная гормональная терапия снижает репаративные процессы тканей. Однако в период активации вирусной инфекции возникает необходимость купировать воспаление. С этой целью могут быть использованы нестероидные противовоспалительные препараты, механизм действия которых имеет общие черты с действием глюкокортикостероидов, воздействуя на ингибирование циклооксигеназ, являющихся ключевыми ферментами, играющими роль в производстве простагландинов и метаболизме арахидоновой кислоты [51, 116, 145].

Современные нестероидные противовоспалительные препараты обладают: высокой проникающей способностью, поддержанием достаточной концентрации, как на глазной поверхности, так и внутри глаза, активностью как в отношении циклооксигеназы-1, так и в отношении циклооксигеназы-2, значительным анальгезирующим эффектом, хорошей переносимостью и низкой токсичностью. Одним из значимых моментов в снижении токсического действия препарата является минимализация кратности его инстилляций. С этой целью оправдано применение Бромфенака, обладающего возможностью поддержания концентрации действующего вещества от 1-кратного закапывания в течение суток. Исследования, проведенные Baklayan G.A., Patterson H.M. с соавт. (2010) показали в 3,7 раза большую активность Бромфенака в сравнении с Диклофенаком, и в 6,5 раз большую, чем у Амфенака [135, 145].

1.3.6. Применение бандажных мягких контактных линз

Применение бандажных мягких контактных линз (МКЛ) достаточно широко используется в лечении хронических нарушений эпителизации роговицы в качестве покровного метода. Данным способом достигают минимизации контакта и риска травматизации роговицы веком [104, 122]. Сроки терапии с применением бандажных МКЛ составляют от 1-2 недель до нескольких месяцев [106, 124, 131]. В качестве особенностей течения заболевания при данной терапии отмечается нестабильный эффект,

приводящий лишь к кратковременному улучшению, с последующим повторным рецидивом заболевания. Кроме того, при длительном применении бандажных МКЛ возникает риск развития осложнений: отека и неоваскуляризации роговицы, развитие бактериальной или грибковой инфекции, инфильтратов, язв роговицы [86, 144, 156].

Все вышеперечисленные методы консервативного лечения не всегда приводят к полной эпителизации роговицы, в ряде случаев ее удается достигнуть лишь на короткое время, после чего вновь наступает рецидив. Иногда в результате лечения происходит лишь снижение индекса поражения роговицы, без полного регресса заболевания. Таким образом, поиск новых методик лечения хронических эрозий роговицы до сих пор остается актуальным.

1.4. Хирургическое лечение хронических нарушений эпителизации роговицы

Длительно сохраняющиеся хронические нарушения эпителизации роговицы при отсутствии эффекта от применяемой терапии могут осложняться развитием язвенного процесса, требующего серьезного хирургического вмешательства, в том числе проведения кросслинкинга, сквозной кератопластики [57].

Первые положительные результаты применения амниотической мембраны в хирургическом лечении хронических нарушений эпителизации роговицы герпетической этиологии были показаны в 1997 г., и данная методика получила довольно широкое распространение [73, 102, 119, 134, 146, 149].

Однако, по данным различных авторов, в ряде случаев требовалась повторная, порой неоднократная трансплантация амниотической мембраны.

Среди других методов лечения хронических нарушений эпителизации роговицы выделяют использование конъюнктивального лоскута, лоскута слизистой ротовой полости, а также блефарорафию [76, 83, 88, 120].

1.4.1. Микродиатермокоагуляция при лечении герпетических кератитов

Диатермокоагуляция представляет собой прижигание тканей переменным током высокой частоты. Данный метод начал применяться для лечения воспалительных заболеваний роговицы с 50-х годов XX века. В 1960 г. Архангельский В.Н. выделил преимущества диатермокоагуляции, характеризующиеся возникновением на месте поражения рубца, морфологически близкого к нормальной структуре, в отличие от результатов, получаемых при применении гальвано- и термокоагуляции [26].

В 1989 г. Каспаров А.А. усовершенствовал метод диатермокоагуляции, разработав набор микроэлектродов и портативный микродиатермокоагулятор. Считается, что в основе механизма действия микродиатермокоагуляции лежат бактерицидный и вирусоцидный эффекты локальной коагуляции пораженной роговицы, возникающие от воздействия высоких температур, а также последующее выскабливание коагулированного струпа. Каспаров А.А. считает целесообразным применение данного метода при: свежих везикулезных высыпаниях в эпителии, наличии везикулезного или древовидного кератита; при начальных и развитых проявлениях гнойной инфекции; при герпетических язвах с гнойной инфильтрацией. В последующих исследованиях Каспарова А.А. показан положительный эффект микродиатермокоагуляции и последующего иссечения пораженных тканей в комбинации с интерферонотерапией (Полудан) у пациентов с древовидным кератитом [18, 22].

В 2012 г. Каспарова Е.А., Зайцев А.В. с соавт. предложили метод микродиатермопластики, заключающийся в коагуляции патологического очага ложкообразным электродом, что позволяет добиться получения гладких стенок зоны дефекта и ложе со сглаженными краями. Это играет значительную роль в ускорении процессов заживления, более быстрой эпителизации и резорбции очагов воспаления [20].

1.4.2. Применение лазерных технологий при лечении нарушений эпителизации роговицы

Лазерная коагуляция с применением аргонового лазера была предложена в 1974 г. Красновым М.М., Каспаровым А.А. и Большуновым А.В. в качестве метода лечения язвенных поражений роговицы. При поверхностных повреждениях, либо более глубоких стромальных язвах роговицы рекомендовалось нанесение коагулятов в плотном порядке, на всю поверхность пораженного участка роговицы. При наличии большого участка поражения рекомендовалось применение лазеркоагуляции в зонах по краю дефектов. Основой терапевтического воздействия данной методики является бактерицидный и вирусоцидный эффекты, получаемые вследствие высокой температуры в очаге воздействия [20, 22]. В 1985 г. в работах Волкова В.В., а позже в исследованиях Бойко Э.В. было продемонстрировано улучшение состояния толщины роговицы с применением иттербий-эрбиевого лазера. При использовании данной методики наблюдалось последующее возникновение нежного рубцевания на месте стромального инфильтрата [5, 8].

В 2014 г. Khater M. с соавт. продемонстрировали положительный эффект использования лазерной коагуляции в лечении 10 пациентов с нарушениями эпителизации роговицы вирусной, грибковой и бактериальной этиологии. В исследуемой группе пациентов наблюдалось полное заживление эпителиального дефекта роговицы и резорбция инфильтратов в течение 3 месяцев наблюдений [112]. В это же время, Казакова К.А., Фролов М.А. (2015) показали положительные результаты в ходе проведения комбинированного лечения с применением консервативных методик и лазерной коагуляции у пациентов с эрозиями и язвами роговицы бактериальной, вирусной и грибковой этиологии. Авторы рекомендовали применение лазерного излучения с длиной волны 1,44 мкм. В результате вышеупомянутого исследования, удалось добиться санации очага воспаления с ускорением наступления фазы пролиферации и полной эпителизации роговицы [14].

В 2000 г. Багаев С.Н., Черных В.В. с соавт. предложили удаление пораженных герпесвирусом тканей роговицы с помощью импульсного лазерного ультрафиолетового излучения¹. Они рекомендовали использовать длину волны 223-270 нм, с длительностью импульса 6-150 нс и частоту следования импульсов лазерного излучения не ниже 2 Гц. Диаметр фокального пятна лазерного излучения при этом находился в пределах 2000 нм, т. к. при больших размерах возникали трудности в точности проведения хирургического вмешательства, ввиду того, что возникал риск задевания здоровых тканей роговицы. Было рекомендовано использование плотности энергии лазерного излучения не менее 50 мДж/см², при меньших значениях абляции практически не происходит, и эта величина является пороговой [11].

В качестве хирургического лечения возможно применение фототерапевтической кератэктомии (ФТК). В настоящий момент возможно проведение ФТК несколькими способами: субэпителиальная ФТК представляет собой удаление эпителия с последующей абляцией 5-10 мкм Боуменовой мембраны, трансэпителиальная техника осуществляется без предварительного удаления эпителия. Также выделяют агрессивную ФТК, которая характеризуется глубокой абляцией (до 20 мкм). Агрессивная ФТК считается наиболее эффективной с точки зрения достижения ремиссии, однако она более опасна осложнениями [91, 132].

1.5. Альтернативные методы терапии хронических нарушений эпителизации роговицы

1.5.1. Применение аутологичной сыворотки

Впервые аутологичная сыворотка в офтальмологии была применена Fox R.I. в 1984 году. На основании проведенных им исследований было показано, что 3-недельный курс сывороткой, разведенной 0,9% раствором

¹Багаев С.Н., Черных В.В., Ражев А.М., Пятин М.М., Жупиков А.А. Способ лечения герпетического кератита. Патент РФ № 2171661 от 14.06.2000. – Опубл. 10.08.2001. Бюл. № 22.

NaCl в соотношении 1:2 улучшил состояние глазной поверхности на 30 глазах у 15 пациентов с сухим кератоконъюнктивитом. При большем разведении отмечалось повторное возникновение жалоб [94].

В 1999 г. Tsubota K. провел исследование, в котором было показано, что применение на протяжении 1 месяца 20% сыворотки у 12 пациентов с синдромом Шегрена значительно уменьшало жалобы и симптомы. Причина улучшения была установлена в ходе динамического наблюдения при окраске флюоресцеином и бенгальским розовым. Она заключалась в том, что после курса лечения наблюдалась активация бокаловидных клеток конъюнктивы и увеличивалось количество муцина. Автору удалось определить ключевые компоненты аутологичной сыворотки: эпидермальный фактор роста, витамин А, трансформирующий фактор роста-β. После успешного опыта использования в лечении синдрома Шегрена ее стали применять при пересадках роговицы, лимбальном кератите, синдроме Стивенса-Джонсона [158, 159].

В 2008 г. Lopez-Garcia J.S. с соавт. показал опыт использования аутологичной сыворотки для лечения аниридийной кератопатии. Позже включение АС в терапию аниридийной кератопатии активно использовали в своих работах Паштаев Н.П., Поздеева Н.А. с соавт. (2013). По данным, представленным в их исследованиях, при использовании аутосыворотки наблюдалось ускорение эпителизации роговицы и повышение стабильности слезной пленки. Наиболее выраженный эффект наблюдали при кератопатии легкой и средней степеней [44].

Целесообразность использования плазмы крови определяется тем, что в ней содержатся необходимые для глазной поверхности питательные вещества, присутствующие в физиологической слезной жидкости. Дополнительным преимуществом является то, что осмолярность, рН и биомеханические характеристики аутологичной сыворотки соответствуют этим же показателям в естественной слезе [45].

Компоненты, содержащиеся в аутоыворотке, обладают трофическим эффектом на клетки эпителия роговицы, регулируя при этом их пролиферацию в роговице и лимбе. Так, TGF- β принимает участие в регенерации эпителия и стромы роговицы, IGF-1 и субстанция Р принимают активное участие в осуществлении адгезии и миграции эпителия роговицы. Тромбоцитарный фактор роста (PDGF), изоформа АВ увеличивают количество митозов и ускоряют рубцевание. Витамин А, содержащийся в аутологичнойыворотке, принимает участие в окислительно-восстановительных процессах, участвует в усилении деления эпителиальных клеток, предотвращает десквамацию роговичного эпителия, фибронектин также принимает участие в клеточной миграции. Лизоцим, содержащийся в аутологичнойыворотке, оказывает бактерицидный и бактериостатический эффекты. Кроме того, для получения антибактериального эффекта аутологичнойыворотки, возможно внутривенное введение антибиотиков за 2-4 часа до момента проведения процедуры получения крови [44].

В 1999 г. Tsubota К. резюмировал результаты проведенных исследований показав, что при применении аутоыворотки бокаловидные клетки увеличивают выработку муцина под влиянием эпителиального фактора роста. Кроме того, эпителиальный фактор роста принимает активное участие в процессе миграции эпителиальных клеток и торможении процесса апоптоза [158, 159].

Объединяя результаты проведенных исследований, в настоящее время можно сформулировать следующие показания для применения аутологичнойыворотки: синдром сухого глаза, нейтротрофическая кератопатия, в том числе врожденного характера, синдром Шегрена, синдром Стивенса-Джонсона, кератопатия при аниридии, эрозии и язвы роговицы [44].

1.5.2. Применение богатой тромбоцитами плазмы

Первые литературные данные об использовании тромбоцитов в офтальмологии встречаются с 1975 года, когда Rosenthal A.R., Harbury С.,

Egbert P. применили комбинацию богатой тромбоцитами плазмы, фибриногена и тромбина, в качестве «клея» для фиксации роговичных пластин у кроликов [138].

Богатая тромбоцитами плазма (БоТП) представляет собой биологический продукт, получаемый из аутологичной крови человека и содержащий высокое число тромбоцитов в небольшом количестве плазмы. Доказано, что стимулирующий эффект БоТП проявляется при концентрации тромбоцитов, равной или более 1 000 000 кл/мкл. При данном соотношении действие достигается за счет наличия повышенной концентрации факторов роста, оказывающих стимулирующий эффект для репарации тканей: эпителиального фактора роста, фактора роста фибробластов, трансформирующего фактора роста β , тромбоцитарного и инсулиноподобного факторов роста [92, 115]. БоТП применяют в лечении раневых повреждений, начиная с 1985 г. [87]. В клинической практике описаны случаи успешного применения БоТП для репарации ожоговых ран [117], трофических язв нижних конечностей [1], мышечно-костных повреждений [143], а также в косметической хирургии [127] и стоматологии [75]. БоТП успешно используют при лечении синдрома сухого глаза различной этиологии [63] в том числе у пациентов после LASIK. Alio J.L., Abad M., Artola A. в 2007 году провели исследования по использованию глазных капель на основе БоТП при дефектах эпителия и язвах роговицы [62].

Susan Tayfun Tanidir с соавторами в 2010 г. было опубликовано исследование об эффективности субконъюнктивального применения БоТП. Экспериментальное исследование проводилось на модели эрозии роговицы у кроликов, животные были разделены на 3 группы: 1-я группа получала субконъюнктивальные инъекции БоТП, во 2-й группе к терапии были добавлены антибактериальные препараты, 3-я группа являлась контрольной и получала инстилляцию 0,9% водного раствора NaCl. В ходе экспериментального исследования было показано наилучшее сочетание

антибактериального, противовоспалительного и репаративного эффекта в группе животных с субконъюнктивальным применением БоТП [155].

Таким образом, в ряде работ была показана актуальность проблемы терапии хронических нарушений эпителизации роговицы при герпесвирусном поражении глаз. Как возможный вариант терапии хронических нарушений эпителизации, активно изучается влияние аутогемотерапии, а в зарубежных работах – и использование богатой тромбоцитами плазмы. Исследований, раскрывающих эффективность и безопасность применения БоТП при хронических герпесвирусных поражениях роговицы, не встречается. Вышеизложенное показывает необходимость изучения эффективности и переносимости терапии с использованием богатой тромбоцитами плазмы как основной или альтернативной методики для успешного внедрения ее в практику лечения хронических нарушений эпителизации роговицы герпесвирусной этиологии. Естественно, встает вопрос о длительности возможного хранения приготовленного препарата. В связи с этим следует провести исследования по оценке стерильности приготовленного препарата на разных сроках хранения и при разных условиях содержания. Применение аутоплазмы у пациентов с герпесом, часто в активной форме, требует проведения противогерпетической терапии первым этапом. Однако наиболее распространенные средства не оказывают влияния на весь спектр герпетических вариаций. Следовательно, для определения предпочтительной первичной противовирусной терапии следует оценить взаимоотношение штаммов вируса и уровня вторичного бактериального инфицирования у пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Формирование клинических групп осуществлялось в порядке решения поставленных в исследовании задач.

2.1. Анализ доли изолированного и сочетанного инфицирования ВПГ 1, 2 типов и цитомегаловируса у пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы

Для оценки частоты и характера формирования хронических нарушений эпителизации роговицы в исследование были включены 120 пациентов (120 глаз) с хроническими кератоконъюнктивитами герпетической этиологии. Условием для включения в группу данного исследования было наличие у пациента нарушений эпителизации роговицы более 15 суток на фоне проведения стандартной репаративной терапии. Кроме того, внимание уделяли наличию ранее диагностированной герпесвирусной инфекции у всех пациентов. Данная часть работы включала иммуноферментный анализ крови, метод полимеразной цепной реакции в мазках с конъюнктивы и микробиологический анализ отделяемого с конъюнктивы.

Иммуноферментный анализ крови пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы

Исследование проводили в клинко-диагностической лаборатории ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. Пациентам, включенным в группу исследования, однократно выполняли иммуноферментный анализ крови (ИФА) для определения титров ВПГ 1, 2 типов и ЦМВ и их соотношения. В исследование включали пациентов с положительными результатами по ЦМВ.

Метод определения основан на твердофазном ИФА. В соответствующие лунки планшета вносили положительные и отрицательные

контрольные образцы, а в остальные лунки вносили по 90 мкл раствора для разведения сывороток и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов крови. Затем планшет заклеивали пленкой и инкубировали в термостате в течение 30 минут при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$. По окончании инкубации липкую пленку снимали и удаляли в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удаляли отсасыванием в сосуд с дезинфицирующим раствором и промывали, добавляя во все лунки по 400 мкл промывочного раствора, с последующим отсасыванием через 30 сек. Процесс промывки повторяли еще 4 раза. Далее, во все лунки вносили по 100 мкл конъюгата. Планшет заклеивали пленкой и выдерживали в термостате в течение 30 минут при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$. Для внесения конъюгата использовали ванночку для реагента и одноразовые наконечники. По окончании инкубации повторно промывали планшет. Затем во все лунки вносили по 100 мкл раствора тетраметилбензидина, планшет выдерживали в защищенном от света месте при температуре от 18 до 25°C . Заключительным этапом вносили во все лунки, в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента.

Величину оптической плотности растворов в лунках измеряли с помощью спектрофотометра («Digiscan», «ASYS Hitech GmbH», Австрия) вертикального сканирования. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не превышало 5 минут. Учет результатов исследования производился с помощью программы BIANET 1.2.0.20.

Качественный анализ наличия вирусного инфицирования пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы

У 120 пациентов, включенных в группу исследования эпидемиологии хронических нарушений эпителизации роговицы, при условии положительных результатов ИФА крови на наличие титров антигенов к ВПГ 1, 2 типов и ЦМВ, проводили качественное (+/-) исследование ДНК вируса простого герпеса и цитомегаловируса с помощью метода полимеразной

цепной реакции (ПЦР) в мазках с конъюнктивы на базе ООО «Герпетический центр», г. Москва.

Данная часть исследования помимо анализа доли изолированного и сочетанного инфицирования ВПГ 1, 2 типов и цитомегаловируса, являлась скрининговой с целью отбора пациентов для последующего использования терапевтических методик, входящих во вторую часть проведенной работы.

Качественное ПЦР-исследование проводилось с помощью набора реагентов для амплификации ДНК вирусов простого герпеса 1, 2 типов и цитомегаловируса с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле («АмплиСенс® HSV/CMV-EPh», Россия). Забор материала осуществляли с помощью стерильного зонда, помещали в транспортную среду при температуре 2-8 °С. В лизирующий раствор, при температуре 65°С, добавляли 50 мкл пробы, после чего подвергали центрифугированию на скорости 5 тыс. об/мин. на микроцентрифуге в течение 5 секунд. После добавления универсального сорбента и перемешивания проводили его осаждение путем центрифугирования. Затем полученные пробы подвергались двукратной процедуре отмывки и центрифугирования с удалением надосадочной жидкости. Следующим этапом пробирки помещали в термостат на 5 минут при температуре 65°С с целью подсушивания сорбента. В пробирки добавляли ТЕ-буфер для эволюции ДНК, прогревали до 65°С и подвергали центрифугированию в течение 1 минуты. Полученную надосадочную жидкость использовали для определения ДНК ВПГ 1, 2 типов и ЦМВ. Пробирки с пробами перемещали в амплификатор на режиме паузы в момент достижения температуры в ячейках 95°С на 2 часа, а затем полученный раствор перемещали в лунки агарозного геля и подвергали электрофорезу в течение 18-20 минут при напряжении 250 В со стабилизацией по напряжению. Результаты ПЦР-диагностики оценивались на наличие, либо на отсутствие на электрофореграмме специфических полос амплифицированной ДНК.

Микробиологическое исследование отделяемого конъюнктивы пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы

Исследование проводили в клинико-диагностической лаборатории ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им.акад. С.Н. Федорова» Минздрава России. Так же у всех 120 пациентов с целью исследования характера и частоты нахождения сопутствующей вторичной бактериальной инфекции на 1-м этапе выполняли микробиологическое исследование отделяемого конъюнктивы с определением чувствительности к антибактериальным препаратам. Забор материала осуществляли с соблюдением правил асептики, с конъюнктивы стерильным тампоном с внутренней поверхности нижнего века движением к внутреннему углу глазной щели. Затем производили посев на сывороточный и тиогликолевый бульоны, после чего материал доставляли в лабораторию для исследования. Микроскопия окрашенных мазков позволяла определить наличие бактериальной микрофлоры для обоснования целесообразности применения антибактериальной терапии на 1-м этапе лечения у пациентов с хроническим нарушением эпителизации роговицы.

2.2. Экспериментальное исследование по оценке стерильности богатой тромбоцитами плазмы

С целью обоснования сроков хранения препарата, исключения вероятности контаминации при заборе, приготовлении и хранении БоТП, было проведено пролонгированное экспериментальное исследование по оценке сохранения стерильности препарата. В ходе эксперимента производилась оценка возможности развития бактериального или грибкового поражения препарата БоТП.

В эксперимент были включены образцы БоТП 10 пациентов. Каждый из образцов был разделен на две части. Первые части 10 образцов хранились в условиях холодильника, вторые части были заморожены.

Хранение 1-й части образцов производилось в течение 7 суток при температуре +4-+6°C. Вторая часть образцов материала хранилась в течение 60 суток при температуре -18°C.

В ходе эксперимента плазма, богатая тромбоцитами засеивалась на две среды. Для обнаружения мезофильно-аэробных, факультативно-анаэробных микроорганизмов использовали тиогликолевую среду при условиях выдерживания материала в течение 8 суток при температуре 36±1 °С. Для обнаружения плесневых и дрожжеподобных грибов использовали среду Сабуро при условиях 24±1 °С в течение 8 суток.

При температуре +4-+6°C посев материала на обе среды производили на следующие сроки:

- 1-й посев - в день забора материала;
- 2-й посев – на 3-и сутки;
- 3-й посев – на 5-е сутки;
- 4-й посев – на 6-е сутки;
- 5-й посев - на 7-е сутки от дня забора.

При температуре -18°C посев материала на обе среды производили на следующие сроки:

- 1-й посев – на 14-й день после забора материала;
- 2-й посев – на 30-й день;
- 3-й посев – на 45-й день;
- 4-й посев – на 60-й день.

2.3. Клиническая оценка терапевтического эффекта богатой тромбоцитами плазмы изолированно и в сочетании с 0,01% сульфатированными гликозаминогликанами

2.3.1. Характеристика клинических групп

Клиническая часть работы была проведена на базе отдела терапевтической офтальмологии и консультативно-диагностического

отделения поликлиники головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России.

В исследование были включены 60 пациентов (60 глаз) из 66, перенесших односторонний кератит герпетической этиологии (с наличием титров ВПГ-1, 2 и ЦМВ по результатам иммуноферментного анализа крови, ПЦР-диагностики), с формированием в дальнейшем хронического нарушения эпителизации роговицы. Все пациенты до включения в группы исследования получали адекватную репаративную терапию, не приводящую к эпителизации роговицы минимум в течение 14 дней.

Критерии включения пациентов в группы исследования:

- перенесенный односторонний кератит герпетической этиологии в анамнезе;
- положительные данные за наличие ЦМВ по данным ИФА крови и ПЦР соскоба конъюнктивы;
- диагноз «рецидивирующая эрозия роговицы» герпетической этиологии (минимум 1 эпизод рецидива, зафиксированный офтальмологом в той же зоне эпителия);
- наличие нарушения эпителизации роговицы в течение минимум 14 дней при наличии адекватной репаративной терапии;
- возраст от 18 до 75 лет.

Критерии исключения пациентов из группы исследования:

- сопутствующие офтальмологические заболевания далекозашедших стадий (глаукома, патология сетчатки, онкологические заболевания и др.);
- сочетанные эпителиальные дистрофии роговицы (со стромальными или эндотелиальными дистрофиями);
- тяжелая соматическая патология в стадии декомпенсации;
- несоблюдение режима приема назначенных препаратов;
- несоблюдение сроков явки для динамического наблюдения.

В результате в исследовании принимали участие 60 пациентов в возрасте от 29 до 67 лет, из них 26 женщин и 34 мужчины. Распределение пациентов по полу и возрасту представлено в таблице 1.

В ходе проведения исследования ставилась цель – оценить эффективность добавления к уже получаемой пациентами общепринятой репаративной терапии, однако не имеющей положительного эффекта, препарата аутологичной богатой тромбоцитами сыворотки крови. Таким образом, группой контроля выступали те же пациенты на момент начала исследования, то есть до начала применения предложенной терапии.

При начале исследования пациенты были разделены на две группы по 30 пациентов (30 глаз). Разделение на две группы диктовалось необходимостью оценки разницы в эффекте в случае монотерапии БоТП и совместного применения БоТП и сульфатированных гликозаминогликанов.

Таблица 1 – Распределение пациентов по полу и возрасту

Количество пациентов / средний возраст (n=60) / 48,37±9,73	I группа (n=30)	II группа (n=30)
Мужчины	n=16/ 50,5±5,9	n=18/ 46,7±6,8
Женщины	n=14/ 49,7±6,8	n=12/ 48,3±7,3

2.3.2. Схемы лечения в группах

Лечение пациентов проводилось в 2 этапа: на 1-м этапе все пациенты обеих групп (60 глаз) получали идентичную противовирусную и репаративную терапию: инстилляцией 0,15% геля Ганцикловир (Зирган, Thea, Франция) 5 раз в день 14 дней, затем 3 раза в день 7 дней, Левифлоксацин 0,5% (Офтаквикс, Santen, Финляндия) 4 раза в день 7 дней, 5% гель Декспантенола (Корнерегель, Baush&Lomb, США) 4 раза в день 14 дней,

Натрия гиалуронат 0,3% (Визмед-гель, TRB Chemedica AG, Германия) на ночь 14 дней, в сочетании с системным применением Валацикловира 500 мг. (Валтрекс, GlaxoSmithKline, Польша) 4 раза в день 7 дней, затем 2 раз в день 14 дней.

К концу 2-й недели терапии, при подготовке к 2-му этапу, включающему взятие венозной крови пациента и дальнейшее приготовление препарата богатой тромбоцитами плазмы, проводился скрининг (серологические тесты) на ВИЧ, гепатит В и С, сифилис.

Второй этап терапии начинался через 14 дней от начала исследования. Выбор 15-го дня был обусловлен тем, что к этому моменту полностью исключались инстилляциии Левофлоксацина и до 3 раз снижалось применение Ганцикловира. Соответственно, снижалась вероятность негативного воздействия препаратов при совместном использовании и нарушение режима использования препаратов пациентами. На 2-м этапе терапии пациенты делились на 2 группы по 30 пациентов (30 глаз). Группа I получала инстилляциии богатой тромбоцитами плазмы (БоТП) 6 раз в день, 5% гель Декспантенола (Корнерегель, Vaush&Lomb, США) 4 раза, Натрия гиалуронат 0,3% (Визмед-гель, TRB Chemedica AG, Германия) на ночь. Группа II получала всю вышеперечисленную терапию в сочетании с инстилляцииями 0,01% сульфатированных гликозаминогликанов (Баларпан-Н, НЭП «Микрохирургия глаза», Москва) 4 раза в день (таблица 2).

Приготовление БоТП проводилось в центре фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России согласно инструкции производителя пробирок.

Таблица 2 – Схема лечения пациентов клинических групп

Этапы лечения	Группа I (n=30)	Группа II (n=30)
1-й этап терапии – 14 дней	<ul style="list-style-type: none"> - Ганцикловир 0,15% 5 раз в день 14 дней, затем 3 раза в день 7 дней; - Левофлоксацин 0,5% 4 раза в день 7 дней; - Декспантенол 5% 4 раза в день 14 дней; - Натрия гиалуронат 0,3% на ночь 14 дней; - Валацикловир 500 мг (Валтрекс) 4 раза в день 7 дней, затем 2 раза в день 7 дней. 	
2-й этап терапии Начало 2-го этапа терапии на 15-й день от начала лечения – от 4 до 8 недель	<ul style="list-style-type: none"> - БоТП 6 раз в день - Декспантенол 5% 4 раза в день - Натрия гиалуронат 0,3% на ночь - Валацикловир 500 мг (Валтрекс) 2 раза в день 7 дней 	<ul style="list-style-type: none"> - БоТП 6 раз в день - Декспантенол 5% 4 раза в день - Натрия гиалуронат 0,3% на ночь - Валацикловир 500 мг (Валтрекс) 4 раза в день 7 дней - Сульфатированные гликозаминогликаны 0,01% (Баларпан-Н) 4 раза в день

Методика приготовления и применения БоТП включала: забор крови пациента из кубитальной вены в объеме 13,5 мл, добавление в пробирку с кровью антикоагулянта (Декстроза + Цитрат натрия) – 1,35 мл, перенесение крови в пробирку (пробирки YCELLBIO-KIT, Корея), двухэтапное центрифугирование (центрифуга «Armed» 80-2s, Россия) в течение 4 минут на скорости 3500 оборотов в минуту (рис. 1, 2, 3). Затем полученная БоТП (1,5-2 мл) переносилась в два стерильных флакона, которые передавались пациенту. 1-й флакон пациент хранил в холодильнике при температуре +4-+6°С и капал полученный препарат 6 раз в день в первые 4 дня. 2-й флакон замораживался при температуре -18° С и начинал использоваться по истечении первых 4 дней терапии.

Кроме того, в условиях процедурного кабинета пациенту проводились субконъюнктивальные инъекции свежеполученной 0,5 мл БоТП 1 раз в неделю.

Курс применения БоТП и всего 2-го этапа лечения составлял от 4 до 8 недель. Минимальный срок проводимой терапии – 4 недели. Пациенты, у которых достигалась полная эпителизация роговицы прекращали получать инстилляцию БоТП.

После завершения 2-го этапа терапии пациенты с полной эпителизацией роговицы переводились на постоянные инстилляцию Натрия гиалуроната 0,16% + Декспантенол+хондроитин сульфат («Стиллавит», ООО «Компания Офтальм-Ренессанс», Россия) 4 раза в день.



Рисунок 1 – Образец пробирки YCELLBIO-KIT для получения БоТП



Рисунок 2 – Пробирка YCELLBIO-KIT с полученным материалом аутологичной богатой тромбоцитами плазмы



Рисунок 3 – Центрифуга «Armed» 80-2s для проведения процедуры получения богатой тромбоцитами плазмы

2.3.3. Клинико-функциональные методы исследования

Пациентам обеих групп в начале исследования и в различные периоды наблюдения проводились следующие клинико-функциональные исследования:

- анкетирование (в начале исследования, через 4 и 8 недель 2-го этапа терапии, 3 и 6 месяцев после окончания лечения);
- визометрия (в начале исследования, через 8 недель 2-го этапа терапии, 3 и 6 месяцев после окончания лечения);
- пневмотонометрия (в начале исследования, через 4 и 8 недель 2-го этапа терапии, 3 и 6 месяцев после окончания лечения);
- биомикроскопия роговицы (в начале исследования, еженедельно в течение всего исследования, через 3 и 6 месяцев после окончания лечения);
- обратная офтальмоскопия с широким зрачком (в начале исследования, через 3 и 6 месяцев после окончания лечения);
- метод клинического рисования (в начале исследования, еженедельно с 1-й по 8-ю неделю 2-го этапа терапии, через 3 и 6 месяцев после окончания лечения);
- тест Ширмера-1 (в начале исследования, еженедельно с 1-й по 8-ю неделю 2-го этапа терапии, через 3 и 6 месяцев после окончания лечения);
- проба Норна (в начале исследования, через 4 и 8 недель 2-го этапа терапии, 3 и 6 месяцев после окончания лечения);
- фотографирование (в начале исследования, через 4 и 8 недель 2-го этапа терапии, 3 и 6 месяцев после окончания лечения);
- окраска роговицы флюоресцеином (в начале исследования, еженедельно с 1-й по 8-ю неделю 2-го этапа терапии, через 3 и 6 месяцев после окончания лечения);
- определение индекса поражения роговицы (в начале исследования, еженедельно с 1-й по 8-ю неделю 2-го этапа терапии, через 3 и 6 месяцев после окончания лечения).

Анкетирование использовали в качестве метода субъективной оценки пациентом жалоб и качества жизни. Система оценки включала ответы пациента на степень выраженности основных симптомов заболевания: боль, покраснение, слезотечение, чувство инородного тела. При ответах на вопросы предлагалось оценить степень выраженности того или иного признака в баллах от 0 до 4 (таблица 3), большее количество баллов соответствовало большей выраженности признака.

В основе разработанной схемы анкетирования лежала шкала TOSS (Total Ocular Score Symptome).

Таблица 3 – Анкета «Система объективного учета субъективных ощущений пациентов»

Симптомы	Все время (4)	Большую часть времени (3)	Примерно половину времени (2)	Иногда (1)	Никогда (0)	Не применимо
Боль						
Покраснение						
Слезотечение						
Чувство инородного тела						
Общее количество баллов						

При **визометрии** проводили учёт только остроты зрения (ОЗ) с максимальной коррекцией. Разница исходной рефракции у всех пациентов была различной и не могла быть принята критерием для оценки эффективности лечения. Соответственно был важен субъективный результат улучшения зрения в каждом конкретном случае для оценки позитивного результата лечения. Визометрию проводили на рефракционном комбайне фирмы «Rodenstock» (Германия) с использованием проектора опто типов фирмы «Zeiss» (Германия).

Биомикроскопию роговицы выполняли с использованием щелевой лампы модели SL-30 фирмы «Opton» (Германия). При первом визите оценивали состояние всех отделов глазного яблока, а также его придаточного аппарата на предмет выявления сопутствующей патологии. При исследовании роговицы оценивали её прозрачность, размер, форму и глубину зоны нарушенной эпителизации, при множественных зонах дезэпителизации – их количество в каждом секторе роговицы, наличие отделяемого, гиперемии конъюнктивы, характеристики слёзного мениска, слёзной плёнки, а также состояние придаточного аппарата глаза. Всем пациентам, включенным в исследование, проводили **обратную офтальмоскопию** с использованием бесконтактной линзы 78 диоптрий.

Фотографирование глаз пациентов осуществляли с помощью фотощелевой лампы модели DC-1, «Topcon» (Япония).

Для оценки степени окрашивания эпителиальных дефектов проводили биомикроскопию и фотографирование с синим кобальтовым светофильтром.

Метод клинического рисования представляет собой графическое изображение дефекта на секторальной схеме роговицы (рис. 4) с отображением всех его характеристик в масштабе рисунка (размер, форма, локализация поражения). Данный метод позволяет сравнивать клиническую картину на первичном и последующих визитах более наглядно и подробно. Преимуществом данного метода является иллюстративное представление о проведенной биомикроскопии с выделением характерных деталей и признаков. Кроме того, он позволяет более четко провести подсчет объема поражения роговицы по зонам и перевести субъективные показатели в объективные за счет расчета индекса поражения роговицы. В настоящем исследовании была использована схема оценки окрашивания и подсчёта индекса поражения с новыми количественными и качественными критериями определения степени тяжести поражения роговицы, разработанная Пронкиным И.А. [47].

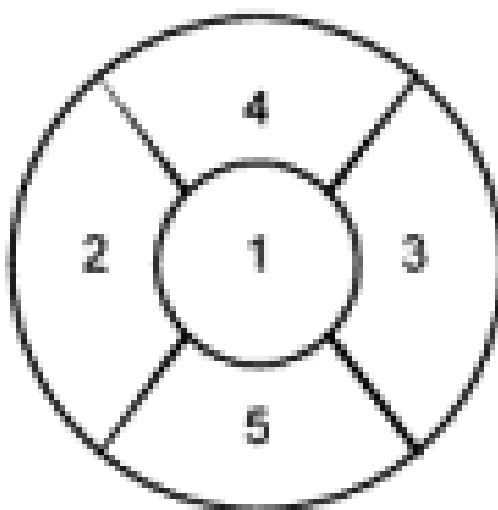


Рисунок 4 – Секторальная схема роговицы

Определение **индекса поражения роговицы** проводили по интегральной 5-секторной схеме с 4-балльной системой оценки индекса поражения в каждом секторе. Сектор 1 соответствует центру роговицы и имеет круглую форму, а четыре равноразмерных сектора расположены вокруг центральной зоны, соответственно, секторы 2-5: верхний (4), темпоральный (2), назальный (3) и нижний (5).

Использовали систему оценки количественных (один, несколько или множественные очаги) и качественных (по площади и глубине поражения) характеристик окрашивания очагов дезэпителизации, выраженных в баллах в каждом секторе: 0 – окрашивания нет; 1 – следы окрашивания; 2 – слабое окрашивание; 3 – окрашивание средней выраженности; 4 – выраженное окрашивание (таблица 4). Итоговым показателем считалась сумма баллов в каждом из секторов, он мог составлять от 0 до 20 баллов.

Таблица 4 – Шкала оценки индекса поражения роговицы при эпителиальных дефектах роговицы

Количество баллов	Качественная и количественная характеристика
0	Окрашивания нет
1	Не более 5 микроочагов окрашивания в секторе
2	От 5 до 15 микроочагов окрашивания в секторе
3	Более 15 микроочагов или 2 сливных очага, или стромальная диффузия красителя в секторе
4	Более 15 микроочагов и 2 сливных очага с поражением стромы в секторе

Тест Ширмера-1 использовали в диагностике и оценке степени тяжести синдрома сухого глаза у пациентов, включенных в исследование. Данный метод позволял легко и неинвазивно определять степень слезопродукции. Оценка степени тяжести синдрома сухого глаза позволяла дифференцировать поражение, нанесенное герпетическим воспалением и дистрофическими процессами вследствие нарушения слезопродукции. Тест проводили с использованием тест-полосок Tear Strips (Contacare Ophthalmis and Diagnostics, Индия). Край полоски располагали под нижним веком в области нижнего слезного мениска на 5 минут. Затем проводили измерение высоты пропитывания тест-полоски слезой в миллиметрах. Нормальное значение слезопродукции считалось в промежутке 15-35 мм.

Пробу Норна (определение времени разрыва слезной плёнки) проводили методом окрашивания слезной плёнки флюоресцеином. На тест-полоску флюоресцеина (FluoStrips, BIO GLO, Индия) наносили каплю Витабакта (Thea, Франция) и дотрагивались до слезного мениска. С целью распределения красителя пациента просили поморгать, затем открыть широко глаз и не моргать. Оценивали состояние слезной плёнки в синем кобальтовом светофилтре щелевой лампы. Определяли время разрыва слезной пленки в секундах, оценивали промежуток времени между

последним морганием и разрывом плёнки. Индикатором разрыва слёзной плёнки являлось темное пятно на месте равномерного окрашивания, с его последующим расширением.

2.4. Статистические методы

Информацию из индивидуальных карт пациентов с данными всех исследований аккумулировали и обрабатывали в программе Microsoft Excel 2007. Выборки соответствовали разбивке пациентов по группам. При анализе данных рассчитывали средние величины параметров (M) и их среднеквадратичное отклонения (σ) с доверительным интервалом 95%. Данные представлены в работе в виде $M \pm \sigma$. Все выборки подчиняются нормальному закону распределения. Для проверки достоверности различий между средними значениями выборок использовали коэффициент Стьюдента (p). Достоверной считалась разница $p \leq 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В данной главе представлены результаты нескольких разноплановых исследований, объединённых одной целью – предложить адекватное и эффективное решение проблемы эпителизации хронических нарушений целостности роговицы при герпетическом инфицировании путем разработки технологии использования БоТП и 0,01% сульфатированных гликозаминогликанов.

Для решения первой задачи исследования, а именно оценки вида и частоты формирования герпесвирусных хронических эпителиальных поражений роговицы, был проведен анализ доли изолированного и сочетанного инфицирования ВПГ 1, 2 типов и цитомегаловируса и описание клинических проявлений герпесвирусного и, в особенности, изолированного цитомегаловирусного поражений роговицы. Для развития понимания этиологии патологического процесса было изучено их сочетание с вторичным бактериальным инфицированием.

При переходе к части исследований, разрабатывающих методику терапии, прежде всего оценивалась безопасность хранения приготовленной аутологичной богатой тромбоцитами сыворотки крови. Для решения этой задачи проводились исследования по сохранности стерильности БоТП на разных временных отрезках и в различных условиях хранения.

Следующая часть исследования была посвящена разработке этапного алгоритма терапии пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы герпетической этиологии.

Необходимость определения минимального количества репаративных препаратов, включаемых в методику, обусловлена исследованием по оценке эффективности БоТП при хронических нарушениях эпителизации роговицы герпесвирусной этиологии изолированно, или в сочетании с препаратом 0,01% сульфатированных гликозаминогликанов (Баларпан - Н). Оценивались результаты сравнительного клинического исследования: производился

анализ функциональных показателей, скорости эпителизации роговицы и вероятности получения полного регресса заболевания при включении в терапию вышеперечисленных препаратов. Результаты оценивались в ранние и отдаленные сроки применяемой терапии.

Таким образом, собственные исследования можно разделить условно на три части. Первая – посвященная анализу изолированного и сочетанного инфицирования ВПГ 1, 2 типов и цитомегаловируса, с участием 120 пациентов. Вторая – экспериментальная по анализу стерильности БоТП, и третья – сравнительная по исследованию эффективности использования БоТП изолированно и сочетанно с участием 60 пациентов.

3.1. Результаты анализа доли изолированного и сочетанного инфицирования ВПГ 1, 2 типов и цитомегаловируса у пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы

В процессе выполнения данной части работы было проведено обследование 120 пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы и наличием положительных результатов выявления цитомегаловирусного и герпетического инфицирования по данным ИФА крови и ПЦР-соскоба с конъюнктивы.

Оценивалось соотношение результатов иммуноферментного анализа крови и качественного исследования ПЦР-материала с конъюнктивы. На основании выявленного характера преобладающего поражения был обоснован выбор противовирусных лекарственных препаратов для дальнейшего ведения пациентов исследуемых групп. По данным наблюдений в ходе терапии было представлено описание особенностей клинической картины возможных вариантов течения герпетической и цитомегаловирусной инфекции.

3.1.1. Соотношение данных результатов иммуноферментного анализа крови, качественного исследования ПЦР-материала с конъюнктивы у пациентов с хроническими нарушениями эпителизации

Проведенный ИФА крови показал наличие у 104 пациентов (86,7%) сочетания герпетической и цитомегаловирусной инфекции. При этом у 9 пациентов (7,5%) было выявлено сочетание как положительного IgM, так и положительного IgG к ЦМВ, что говорит об относительно недавнем инфицировании цитомегаловирусной инфекцией данной группы пациентов. Изолированное наличие лишь ЦМВ-инфекции было выявлено у 16 пациентов (13,3%) (рис. 5).

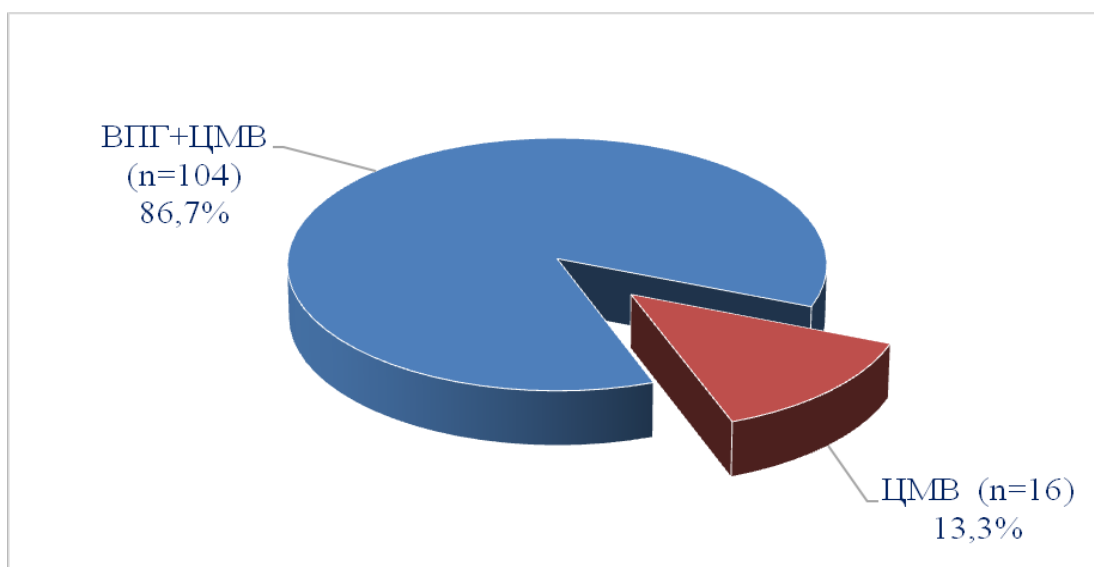


Рисунок 5 – Оценка изолированного или сочетанного наличия ВПГ 1, 2 типов и ЦМВ-инфекции

При оценке степени выраженности герпетической или цитомегаловирусной инфекции среди 104 пациентов, равное значение титров наблюдалось у 20 пациентов (16,7%). Превалирование показателя IgG ЦМВ над ВПГ 1, 2 типов в 2 раза наблюдалось у 25 пациентов (20,8%), в 4 раза – у 18 (15%), в 8 раз – у 4 пациентов (3,3%). Превышение показателей ВПГ IgG над ЦМВ в 16 раз наблюдалось у 2 пациентов (1,7%), в 8 и 4 раза – по 5 пациентов (4,2%), в 2 раза – у 25 пациентов (20,8%). Оценка данных результатов ИФА крови представлена в таблице 5.

Таблица 5 – Варианты сочетания титров герпетической и цитомегаловирусной инфекции у пациентов с герпетическими кератоконъюнктивитами, (n=104), М (%)

Отношение показателей ЦМВ IgG / ВПГ IgG в количество раз	Число случаев	%
2	25	20,8
4	18	15
8	4	3,3
1 (равны)	20	16,7
0,0625 (меньше в 16 раз)	2	1,7
0,125 (меньше в 8 раз)	5	4,2
0,25 (меньше в 4 раза)	5	4,2
0,5 (меньше в 2 раза)	25	20,8

Среди 120 пациентов с положительными результатами ИФА крови на герпесвирусные инфекции, которым проводилась качественная ПЦР-диагностика, положительный результат отмечался у 66 пациентов, при этом, наличие сочетанной (ВПГ-1, 2 и ЦМВ) инфекции наблюдалось у 37 пациентов, а изолированное герпетическое и цитомегаловирусное поражение у 25 и 4 соответственно.

В дальнейшем, 60 пациентов из числа тех, у кого были определены положительные результаты исследования ПЦР-материала с конъюнктивы на герпесвирусную инфекцию, были отобраны для второго этапа исследований – оценки эффективности предложенной терапии состояний хронических нарушений эпителизации роговицы.

3.1.2. Выбор противовирусных лекарственных препаратов при дальнейшем ведении пациентов исследуемой группы

Учитывая большой процент пациентов, пораженных ЦМВ, при выборе назначаемой терапии предпочтение отдавалось применению противовирусных препаратов наиболее широкого спектра действия, направленных как на подавление ВПГ, так и на купирование цитомегаловирусной составляющей (Ганцикловир 0,15%, Валцикловир 500

мг). Подобный выбор терапии уже в ходе первого этапа лечения давал положительные субъективные и объективные результаты. Важно отметить, что эти пациенты, ранее получавшие препараты ацикловира, отмечали длительно сохраняющийся болевой синдром, медленно наступавшее улучшение, а также часто возникавшие рецидивы заболевания. Поэтому без динамики на фоне проведенного в анамнезе лечения и хронических нарушений эпителизации они были в дальнейшем включены в клиническую часть исследования настоящей работы. Это косвенно подтверждает возможную связь хронического течения кератоконъюнктивитов данной группы с цитомегаловирусной инфекцией.

3.1.3. Описание особенностей клинической картины возможных вариантов течения сочетанной герпетической и цитомегаловирусной инфекции

Учитывая наличие в скрининговом исследовании пациентов, имевших лишь цитомегаловирусную инфекцию (n=16), а также в значительном числе случаев превалирование ее титров (n=47), либо равное соотношение с ВПГ-1, 2 (n=20), была выдвинута гипотеза о возможной причастности цитомегаловируса к хроническим нарушениям эпителизации роговицы.

При биомикроскопии 83 пациентов с хроническими кератоконъюнктивитами герпетической этиологии, обращалось внимание на наличие в ряде случаев одновременно нескольких участков поражения на глазной поверхности. При этом практически всегда число участков поражения было равно количеству рецидивов заболевания, выявляемых в анамнезе у данной группы пациентов. Время возникновения рецидивов заболевания при этом варьировало и составляло в среднем 1 раз в 2-3 месяца с момента окончания проведения противовирусной терапии. Подобное формирование нескольких очагов поражения на разных участках роговицы не характерно для клинических поражений ВПГ 1 и 2 типов. Таким образом, было высказано предположение, что подобные поверхностные формы

кератоконъюнктивита могут наблюдаться у пациентов с наличием ЦМВ-составляющей.

При исследовании данной категории пациентов был проведен анализ выявления измененных участков роговицы по пяти секторам. Данные распределения поражения роговицы по секторам представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Распределение зон поражения глазной поверхности у пациентов с герпетической и цитомегаловирусной инфекцией по секторам (n=83), М (%)

Пациенты	Центральный сектор	Верхний сектор	Нижний сектор	Назальный сектор	Темпоральный сектор
ВПГ-1, 2 + ЦМВ (n=67)	15 (18%)	12 (14,5%)	14 (16,9%)	12 (14,5%)	14 (16,9%)
ЦМВ (n=16)	3 (3,6%)	2 (2,4%)	3 (3,6%)	5 (6,0%)	3 (3,6%)

При этом у пациентов, имевших превалирование титров ЦМВ инфекции к ВПГ-1, 2, чаще наблюдалась неоваскуляризация с формированием одного или нескольких центральных крупных сосудов, проходящих по центру дефекта роговицы.

На основании анализа результатов ведения пациентов с наличием сочетанной герпетической и цитомегаловирусной инфекции, а также с изолированным цитомегаловирусным поражением, в качестве особенностей, выявляемых у пациентов с рецидивирующими формами удалось выделить:

- наличие одновременно нескольких участков поражения, часто коррелирующих с количеством рецидивов заболевания в анамнезе (71% случаев),
- поражение всех секторов роговицы в равной степени (28% случаев),
- преимущественно поверхностное поражение роговицы, чаще не глубже эпителия, однако с возможным отеком эндотелия в той же зоне (58% случаев),

- развитие первичного воспаления происходит в глубоких слоях эпителия, причем образование эрозии не обязательно и скорее вторично (36% случаев),

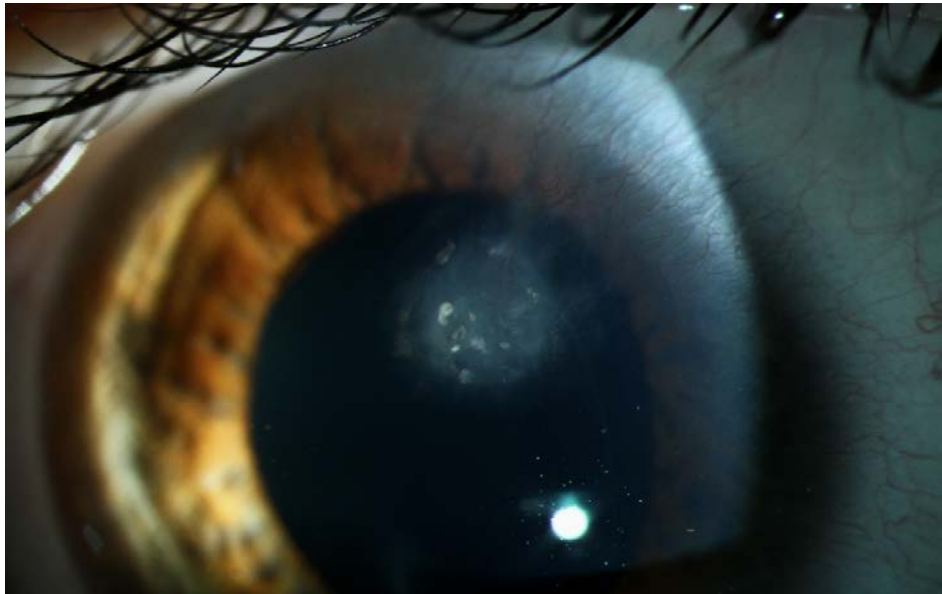
- достаточно частое отложение пигмента в эпителизированной зоне поражения (44% случаев),

- формирование неоваскуляризации по типу одного или нескольких агрессивных крупных центральных сосудов, проходящих в зону поражения (84% случаев).

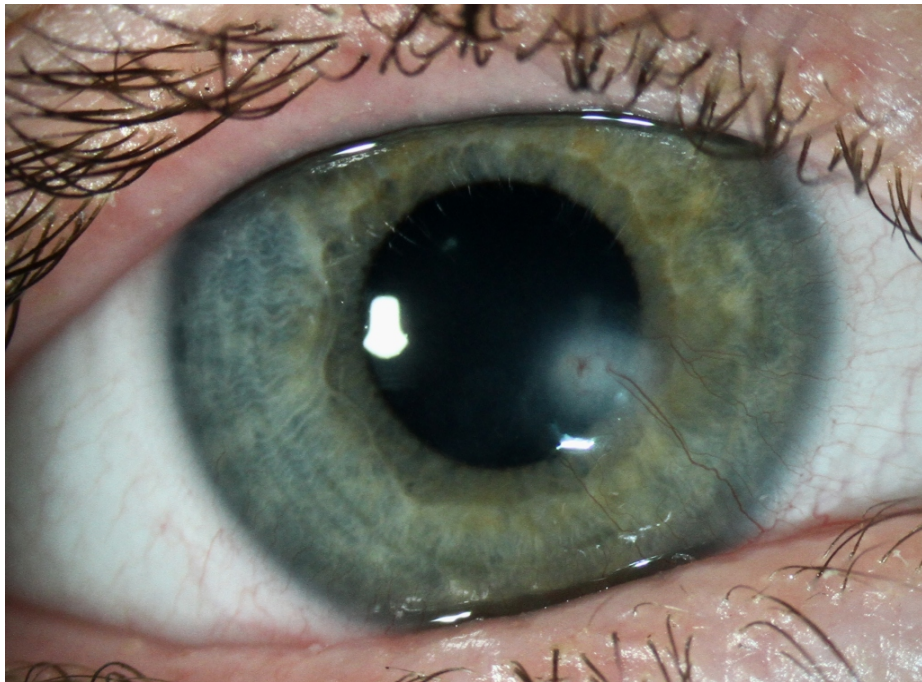
Клинические примеры:

Пациент К., 31 год, визуализировалось помутнение в парацентральной зоне роговицы, с участками пигментации и сосудистой реакцией. Показатели ИФА крови - Ig G к ЦМВ в разведении 1 к 1600 (рис. 6а). Пациент Н. 49 лет, с схожими клиническими проявлениями, однако отсутствовали участки пигментации (рис. 6б).

Примером множественных поражений поверхности роговицы, развивающихся последовательно с периодичностью в несколько месяцев являлся Пациент П., 38 лет, у которого визуализировались несколько участков поражения с зонами окрашивания флюоресцеином. По данным ПЦР и ИФА, у пациента было выявлено только цитомегаловирусное инфицирование в активной форме: титры к ЦМВ выявлялись в высоком значении Ig G 1 к 1600. Пациент считал себя больным в течение 1,5 лет и сообщил, что пережил за это время пять обострений заболевания, что примерно соответствовало количеству отграниченных поражений эпителия роговицы (рис. 7).



а) – Пациент К., 31 год, ИФА крови – Ig G к ЦМВ 1:1600



б) – Пациент Н., 49 лет, ИФА крови – Ig G к ЦМВ 1:1600

Рисунок 6 – Биомикроскопия на момент первичного приема

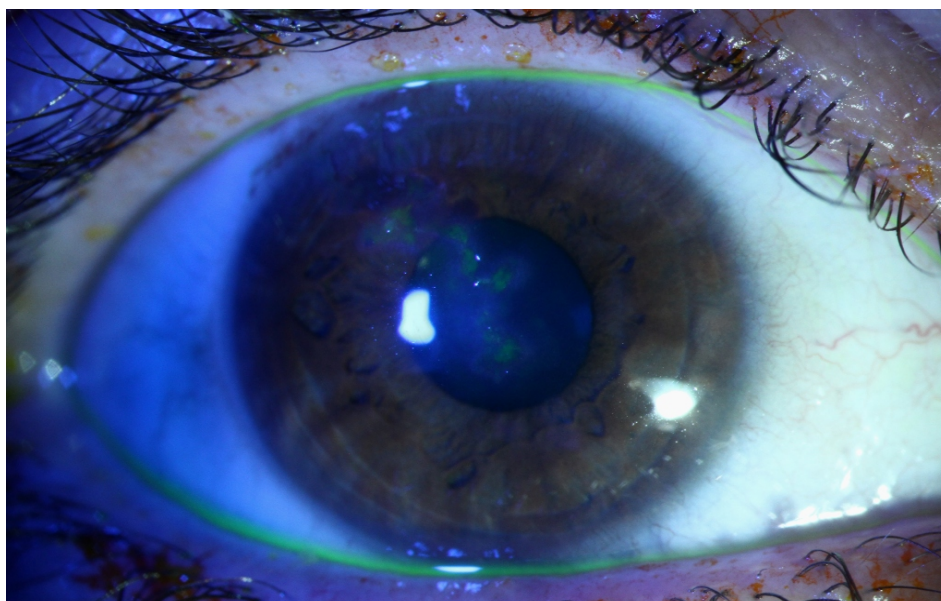


Рисунок 7 – Пациент П., 38 лет, Ig G к ЦМВ 1:1600, биомикроскопия на момент первичного осмотра, окрашивание флюоресцеином пораженных зон глазной поверхности

Следует также оценивать сочетанный характер поражения герпетической и цитомегаловирусной инфекцией. Так, в качестве клинического примера: пациент Б., 39 лет, на момент первичного приема при биомикроскопии визуализировалось «дисковидное» поражение, частично затрагивавшее оптическую зону. В центре диска при биомикроскопии визуализировались несколько сливных участков пораженной ткани глазной поверхности. При этом результаты ИФА дали равные показатели титров Ig G к ВПГ-1, 2 и ЦМВ инфекции в разведении 1 к 3200. Данный клинический пример демонстрирует участок поражения ВПГ-1, 2 в форме диска, внутри которого находится участок поражения ЦМВ-этиологии с сосудистой реакцией, идущей непосредственно в зону поражения (рис. 8).

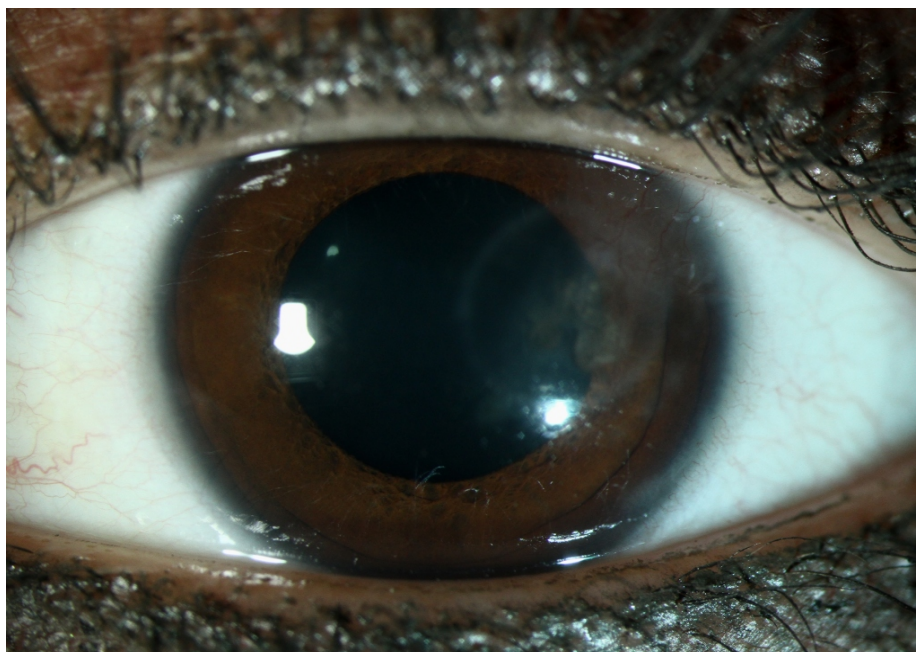
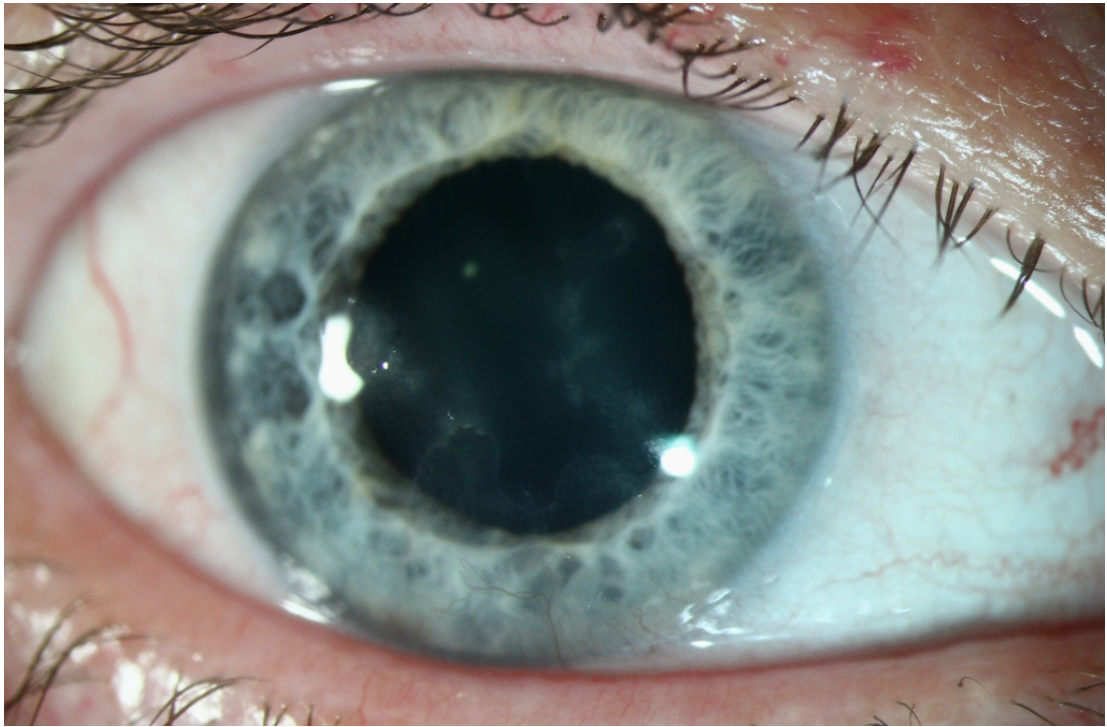


Рисунок 8 – Пациент Б., 39 лет, ИФА – равные показатели титров Ig G к ВПГ 1, 2 и ЦМВ 1:3200, биомикроскопия на момент первичного осмотра

Наличие выраженных титров к ЦМВ при относительно низких титрах ВПГ 1, 2 типов могло являться дополнительным фактором, говорящим о непосредственном влиянии ЦМВ-инфекции. Так, на примере пациента Р., 60 лет, обратившегося по поводу частых рецидивов заболевания и болевого синдрома в сильной степени выраженности, можно было увидеть наличие одновременно нескольких участков измененной глазной поверхности довольно существенного размера, занимавших большую площадь поверхности роговицы. Практически на всех участках измененный эпителий прокрашивался флюоресцеином. По результатам ИФА крови отмечалось наличие титров Ig G к ЦМВ в разведении 1 к 3200, при этом наличие титров к ВПГ-1, 2 составляло 1 к 400 (рис. 9а, б).



а) – Наличие нескольких участков измененной глазной поверхности



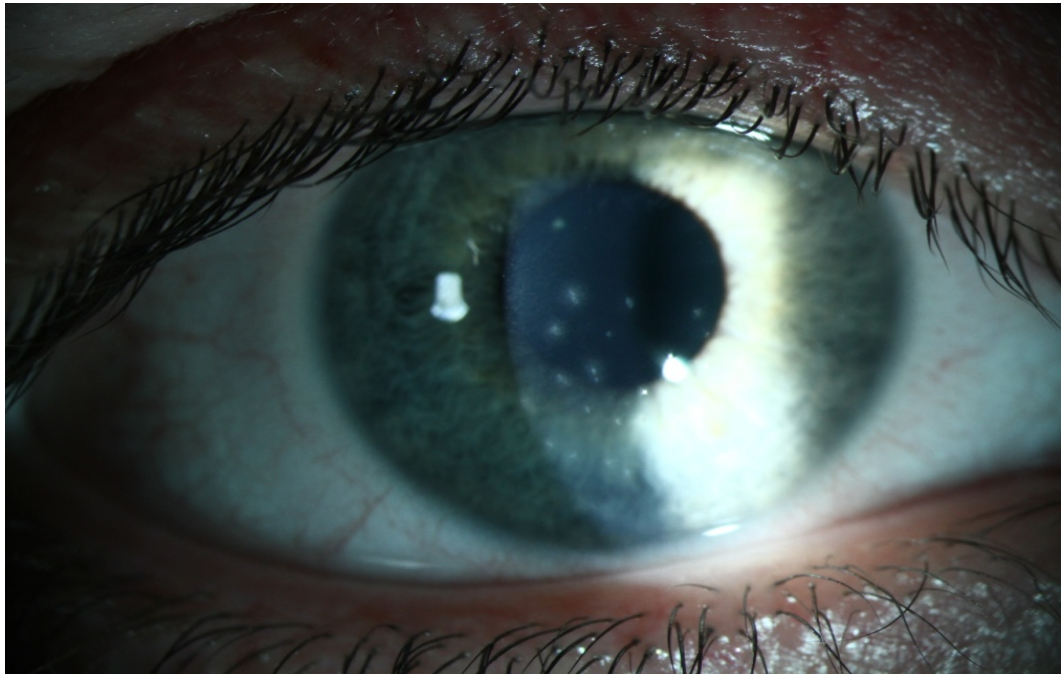
б) – Визуализируется окрашивание флюоресцеином пораженных зон

Рисунок 9 – Пациент Р., 60 лет, Ig G к ЦМВ – 1:3200, ВПГ 1, 2 – 1:400.

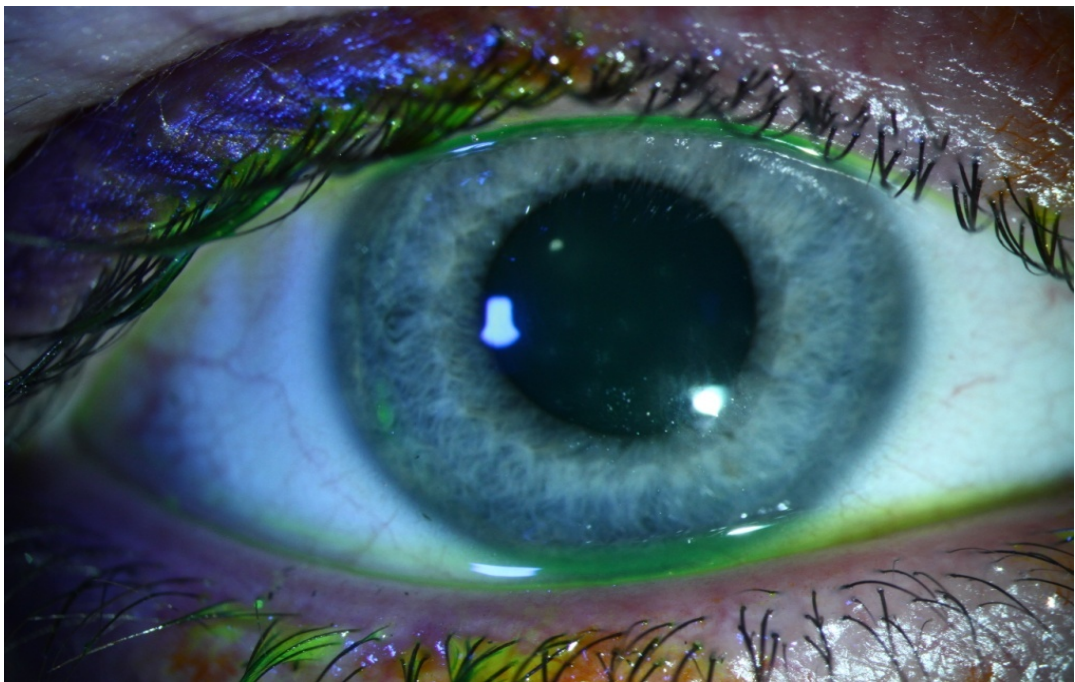
Биомикроскопия на момент первичного осмотра

В настоящем исследовании среди пациентов, имевших изолированное ЦМВ-поражение, было 3 случая с клинической картиной кератита Тайджесона. Клиническая картина проявлялась субэпителиальными инфильтратами роговицы, а также зонами дезэпителизации роговицы над инфильтратами. При этом в анамнезе у данной категории пациентов отмечалась резко-положительная динамика на фоне применения глюкокортикостероидов и исчезновение симптомов заболевания на фоне их применения в течение нескольких дней с полным очищением поверхности роговицы. Несмотря на наличие низких титров ЦМВ-инфекции, в настоящий момент их наличие может быть возможной гипотезой этиологии заболевания (рис. 10а, б). Против данной теории выступает тот факт, что проведение изолированной терапии этих состояний только противовирусными препаратами было неэффективно.

Динамика эпителизации и формирования полной прозрачности роговицы у пациента с кератитом Тайджесона, ассоциированного с ЦМВ, на фоне проведенного короткого курса гормональной терапии представлена на рис. 11а, б.

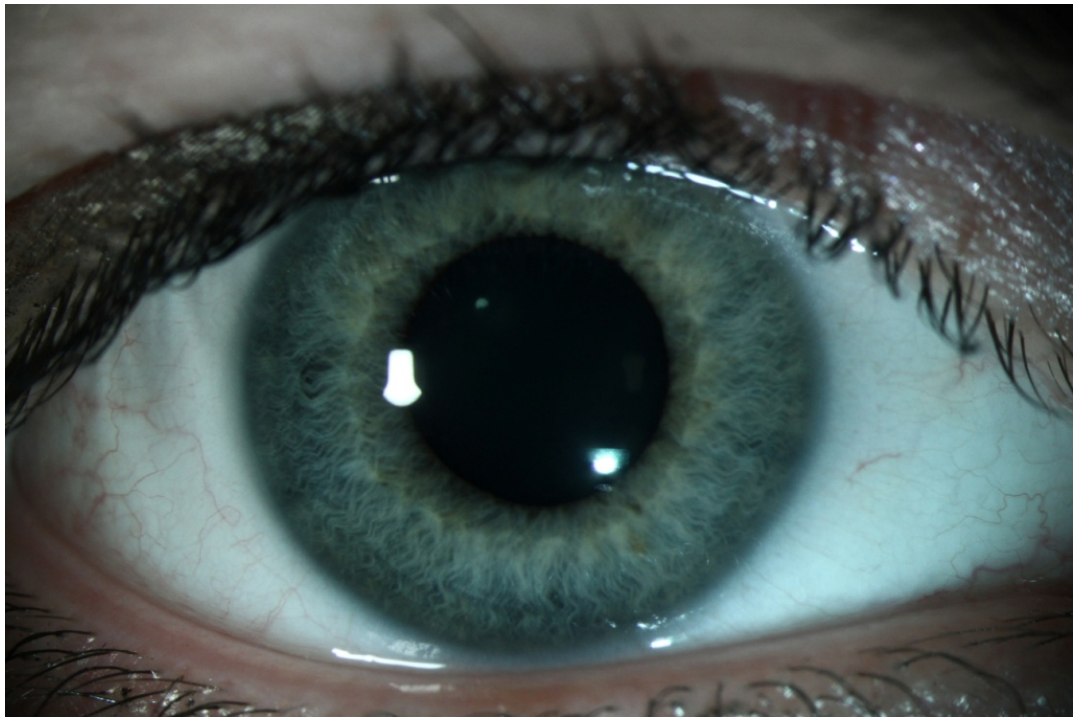


а) – Множественные субэпителиальные инфильтраты роговицы

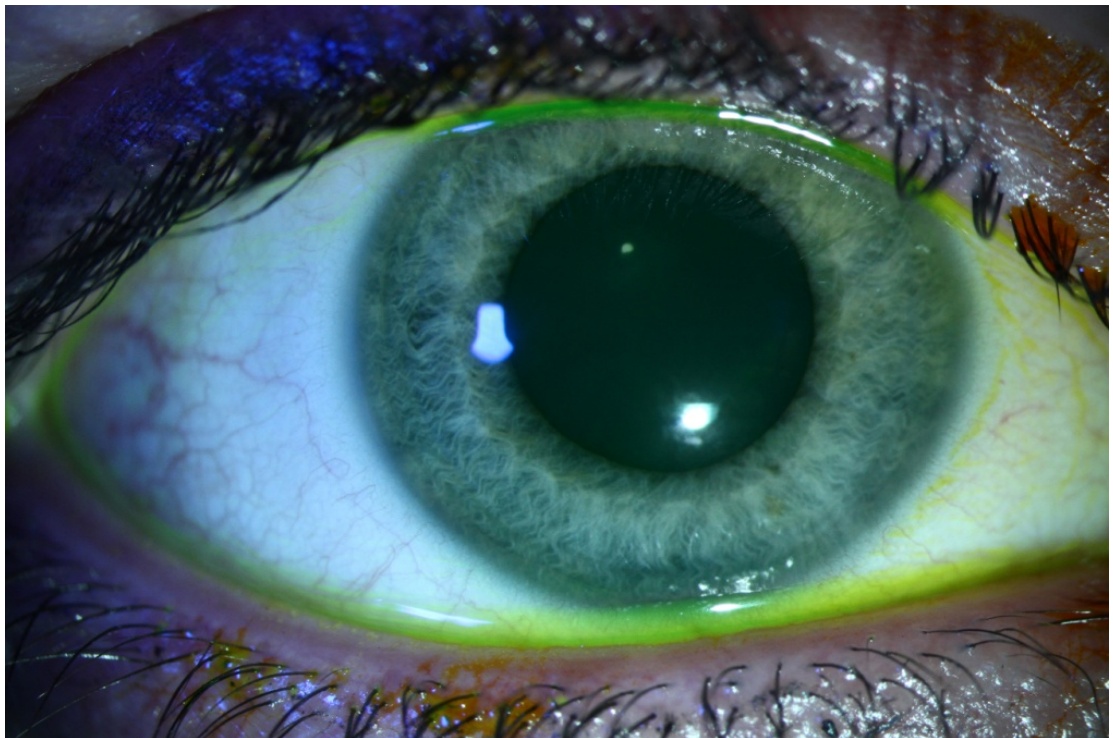


б) – Окрашивание флюоресцеином, прокрашиваются зоны разрыва эпителия роговицы

Рисунок 10 – Пациент А., 28 лет, Ig G к ЦМВ 1:200,
биомикроскопия OD до лечения



а) – Визуализируется отсутствие инфильтратов на роговице



б) – Окрашивание флюоресцеином, полная эпителизация

Рисунок 11 – Пациент А., 28 лет, биомикроскопия OD на фоне проведенной терапии

Таким образом, проведенное лабораторное и описательное исследование дали возможность определить вероятность ЦМВ-поражения роговицы, показано высокое наличие сочетанной ВПГ 1, 2 и ЦМВ-инфекции (86,7%). Кроме того, среди пациентов с наличием сочетания вышеперечисленных титров, более чем в половине случаев наблюдалось превалирование титров ЦМВ, либо их равное соотношение с ВПГ 1, 2 типов. Удалось показать вероятность ЦМВ-поражения роговицы и выделить некоторые клинические признаки данного поражения. На основании полученных результатов в дальнейшем в схемы терапии хронических нарушений эпителизации были введены препараты широкого противовирусного действия.

3.2. Результаты микробиологического исследования отделяемого конъюнктивы у пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы

В ходе выполнения данной части работы оценивались результаты микробиологического исследования отделяемого конъюнктивы у 120 пациентов (120 глаз) с герпесвирусными хроническими нарушениями эпителизации роговицы.

Известно, что одной из наиболее актуальных проблем в настоящее время является увеличение устойчивости возбудителей бактериальных инфекций к этиотропной терапии. Довольно часто речь идет не просто о резистентности микроорганизмов к отдельно взятым препаратам, а о феномене множественной устойчивости – полирезистентности, ограничивающей выбор эффективной противомикробной терапии. Следовательно, в данной части исследования было важно оценить не только характер и частоту встречаемости сопутствующей вторичной бактериальной микрофлоры, но также резистентность к основным группам антибактериальных препаратов.

В ходе проведения микробиологического исследования было выявлено наличие патогенной микрофлоры у 29 пациентов (24,2% случаев). При этом у 23 пациентов (19,2% случаев) был выделен *Staphylococcus epidermidis*, у 4 пациентов (3,3% случаев) – *Staphylococcus aureus*, у 2 пациентов (1,7%) – *Enterococcus faecalis*. Распределение пациентов с выявленными возбудителями бактериальной инфекции представлено на рисунке 12.

Полученные результаты исследования вида микрофлоры пациентов не отличались от литературных данных и характеризовались выявлением грамположительных условнопатогенных кокков – *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus aureus*.

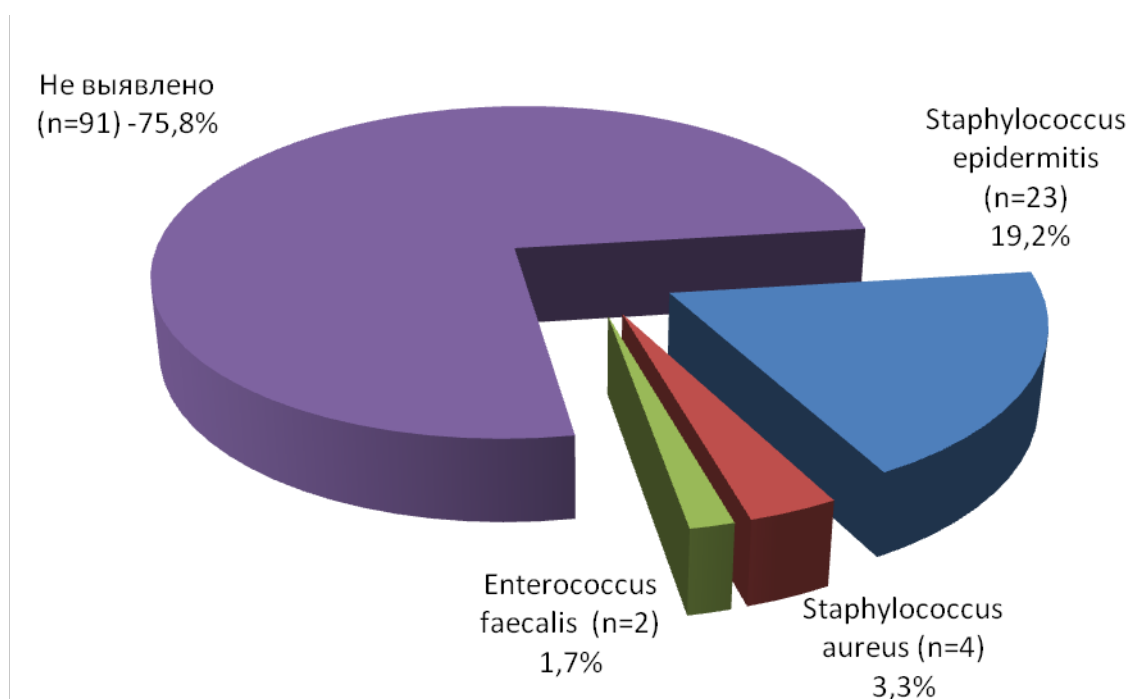


Рисунок 12 – Оценка вариантов патогенной бактериальной микрофлоры у пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы

Полученные данные о чувствительности патогенных микроорганизмов показали наличие резистентности к хлорамфениколу у 24 пациентов (82,8% случаев), к эритромицину у 27 пациентов (93% случаев), ципрофлоксацину у 20 пациентов (69% случаев), к офлоксацину у 19 пациентов (65,5% случаев). При этом у 25 пациентов (86,2% случаев) отмечалась резистентность как

минимум к 3-м группам антибактериальных препаратов одновременно. Однако, ни в одном случае не отмечалась устойчивость или резистентность к фторхинолонам 3-го и 4-го поколений.

Подобная агрессивная резистентность может быть обусловлена длительностью воспалительного процесса у данной группы пациентов и неоднократным использованием ими различных антибиотиков в каплях на разных этапах терапии. Сдвиг микрофлоры в сторону грамположительной и наличие так называемой «условнопатогенной» микрофлоры затрудняет принятие решения о необходимости проведения антибиотикотерапии.

Проведение бактериологического исследования желательно, но не всегда возможно. Так как, наибольшей чувствительностью грамположительная микрофлора как правило обладает к гентамицину, левофлоксацину и моксифлоксацину, а эритромицин, хлорамфеникол и ципрофлоксацин имеют низкую антимикробную активность при повторном применении, рекомендованный выбор при назначении эмпирической терапии было предложено делать в направлении назначения именно фторхинолонов 3-го поколения.

Таким образом, определение сочетанного бактериального инфицирования у пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы герпесвирусной этиологии явилось обоснованием целесообразности назначения антибактериальной терапии с целью профилактики вторичной бактериальной инфекции на первом этапе лечения данных пациентов.

3.3. Анализ стерильности аутологичной БотП при хранении

С целью обоснования сроков хранения, исключения вероятности контаминации при заборе, приготовлении и хранении БотП проведено экспериментальное исследование по оценке стерильности сразу после

приготовления, в разные сроки после него и при разных условиях хранения (рис. 13, 14).

В результате не было выявлено контаминации бактериальной или грибковой микрофлорой ни сразу после приготовления богатой тромбоцитами плазмы, ни на сроках 3-и, 5-е, 6-е, и 7-е сутки от момента забора материала при хранении при температуре +4-+6°C.

При хранении при температуре -18°C проведенное исследование показало отсутствие контаминации на сроках 15 дней, 1 месяц и 45 дней во всех 10 образцах, на сроке хранения 2 месяца был отмечен рост бактериальной микрофлоры в 1 из образцов.

При этом забор крови для проведения эксперимента осуществлялся с использованием раствора Глюгицира (Цитрат натрия + Декстроза, ОАО «Синтез», Россия). Данный гемоконсервант с одной стороны, за счет действия Цитрата натрия обеспечивает антикоагулянтный эффект путем связывания катионов кальция анионами цитрата. С другой стороны, содержащаяся в препарате глюкоза служит питанием для клеток крови. Естественно, наличие подобного гемоконсерванта вызвало необходимость тщательного проведения данного исследования в связи с высоким риском создания агрессивной питательной среды для микроорганизмов.

Таким образом, экспериментальная часть по оценке стерильности была проведена с целью разработки и оптимизации схемы терапии с включением БоТП. Было признано возможным и безопасным использование препарата БоТП в течение минимум 4 дней при условии хранения при температуре +4-+6°C и минимум 1-го месяца с момента проведения процедуры его получения при условии хранения при температуре -18°C.

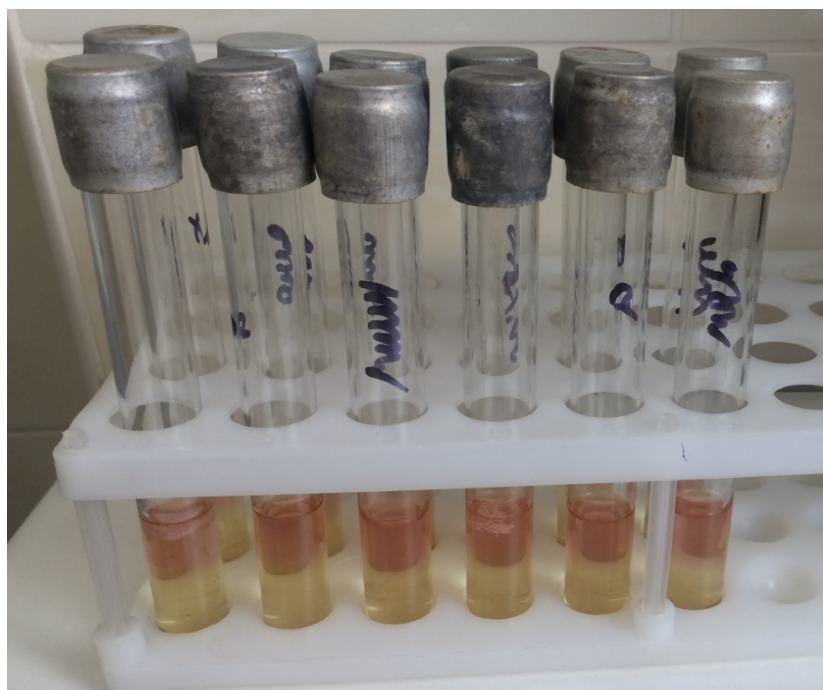


Рисунок 13 – Оценка бактериальной микрофлоры материала с использованием тиогликолевой среды



Рисунок 14 – Оценка выделения дрожжей, плесневых грибов с использованием среды Сабуро

3.4. Разработка этапной методики терапии у пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы герпетической этиологии

Полученные результаты лабораторного и описательного исследования, показавшие целесообразность назначения антибактериальной и противовирусной терапии широкого спектра действия, а также анализ сохранения стерильности аутологичной БоТП, позволили выработать этапную методику терапии у пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы герпесвирусной этиологии с помощью изолированного и сочетанного применения богатой тромбоцитами плазмы и 0,01% сульфатированных гликозаминогликанов.

Изначально, на основании полученных данных, важным являлся подробный сбор анамнеза пациентов, выявление частоты обострений заболевания и динамики на фоне применения различных типов консервативного лечения.

При смене терапии и переходу к назначениям инстилляций аутологичной БоТП наиболее целесообразным можно было считать проведение предварительного специфического противовирусного лечения и только затем переход к агрессивному репаративному лечению. Это обусловлено двумя факторами: во-первых, планировалось использовать аутосыворотку пациента, уже зараженного вирусами герпетической группы, и во-вторых, применение столь большого количества инстилляционных препаратов могло привести к местной токсико-аллергической реакции, способной только ухудшить состояние роговицы. Ввиду многообразия форм вирусов герпетической группы предпочтение отдавалось препаратам, специфичным не только к ВПГ 1 и 2 типов, но и к ЦМВ (Валацикловир, Ганцикловир). Во время проведения 1-го этапа терапии в схеме лечения пациентов использовалась антибактериальная терапия (фторхинолоны 3-го

поколения) и оставались так называемые «классические» репаративные препараты.

На 2-м этапе терапии кроме классических репаративных препаратов использовалась аутологичная БоТП пациентов, инстиллянии производились 6 раз в день, курс лечения составлял от 4 до 8 недель терапии с проведением процедуры получения БоТП 1 раз в 2 недели. В настоящем исследовании планировался сравнительный анализ терапевтического эффекта БоТП изолированно, либо в сочетании с 0,01% сульфатированными гликозаминогликанами. Следовательно, пациенты были разделены на две группы по 30 человек. Группа I получала в составе терапии БоТП, группа II дополнительно получала инстиллянии 0,01% сульфатированных гликозаминогликанов (Баларпан-Н) 4 раза в день. Кроме классических репаративных препаратов и БоТП, было обязательно использование крайне вязких слезозаместителей в качестве «ночных» защитных препаратов. Целью «ночного» слезозаместителя являлось дополнительное увлажнение глазной поверхности и создание защиты для свежего эпителия роговицы от эффекта адгезии к нему века при условии слабой подвижности глаза во время сна.

Таким образом, предложенная методика позволяла провести подготовительный антибактериальный и противовирусный этапы терапии для последующего использования БоТП с нивелированием активации герпетического процесса. На основании разработанной этапной методики терапии в дальнейшем планировался сравнительный анализ скорости эпителизации роговицы и выявление достоверно значимых различий в группах исследования.

3.5. Результаты исследования по эффективности применения БоТП изолированно и в сочетании с гликозаминогликанами

В исследование были включены 60 пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы и доказанным наличием

цитомегаловирусной и/или герпесвирусной инфекции, отобранных после проведения анализа доли изолированного и сочетанного инфицирования ВПГ 1, 2 типов и цитомегаловируса. Контролем эффективности терапии служило состояние пациентов до начала лечения. В ходе лечения пациенты получали два этапа терапии – противовирусную и антибактериальную в начале, и вторым этапом – репаративную с применением БоТП. Пациенты были разделены на две группы с аналогичной схемой лечения. Однако во второй группе кроме БоТП, пациенты получали инстиллянии 0,01% сульфатированных гликозаминогликанов.

3.5.1. Результаты первичной диагностики пациентов, включенных в исследование

Результаты проведенного анкетирования выявили наличие жалоб пациентов минимум по трем пунктам одновременно. При этом средний показатель жалоб до начала проведенной терапии составлял: в группе I $8,27 \pm 2,32$, в группе II – $8,47 \pm 1,91$ из 16 возможных баллов. При этом у всех 60 пациентов на момент первичного приема в качестве одной из ведущих жалоб выступала боль, и кроме того, у 54 пациентов группы исследования (90%) отмечалась равная степень выраженности жалоб на боль и светобоязнь.

Изначальная величина КОЗ пациентов, включенных в исследование, составляла от 0,05 до 0,7 со средним значением $0,4 \pm 0,2$, идентичным по группам.

При биомикроскопии наблюдались участки дезэпителизации роговицы различной формы и размеров, как точечные зоны нарушения эпителия, в ряде случаев сливного характера, так и более глубокие поражения с вовлечением передних отделов стромы. Как уже было описано ранее, в исследование были включены пациенты, имевшие хроническую дезэпителизацию роговицы, что характеризовалось сохранением участков, прокрашиваемых флюоресцеином, несмотря на применяемую классическую репаративную терапию. Как

правило, в зоне поражения роговицы при биомикроскопии визуализировались отек и нарушение прозрачности разной степени выраженности. Наблюдались изолированные либо сочетанные формы нарушений эпителизации: точечные дефекты, картообразные, линейные по типу «ветки», нарушения эпителизации неправильной формы и др. (рис. 15, 16). При этом помимо оценки индекса поражения роговицы по секторам в баллах, производился подсчет изначально выявленных очагов дезэпителизации по всей площади роговицы. И, несмотря на то, что у части пациентов, включенных в исследование, наблюдались единичные участки поражения роговицы, превалировало наличие множественных очагов дезэпителизации (таблица 7).

Таблица 7 – Оценка количества отдельных участков дезэпителизации по всей площади роговицы в исследуемых группах (n = 60), М (%)

Группы	1 участок дезэпителизации	2 участка дезэпителизации	3 и более участков дезэпителизации
Группа I (n=30)	n=6 (20%)	n=8 (26,7%)	n=16 (53,3%)
Группа II (n=30)	n=5 (16,7%)	n=9 (30%)	n= 16 (53,3%)

При этом подсчет среднего индекса поражения проводился отдельно в каждой группе исследования. Результаты индекса поражения роговицы на момент первичного визита пациентов представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Показатели среднего индекса поражения роговицы в группах (n=60), (M±σ)

Группы	Хронические нарушения эпителизации роговицы (n=60)
Группа I (n=30)	7,1±1,9
Группа II (n=30)	6,9±1,8

Показатели проведенного теста Ширмера-1 выявили снижение слезопродукции в группах I и II, значение пробы Ширмера-1 при начальной диагностике пациентов в группах находилось в пределах от 4 до 12 мм.

В результате проведения пробы Норна выявлено снижение времени разрыва слезной пленки в группах I и II. Значения теста Ширмера-1 и пробы Норна на момент первичной диагностики пациентов представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Показатели теста Ширмера-1 и пробы Норна в исследуемых группах на момент первичного осмотра (n=60), (M±σ)

Группы	Тест Ширмера-1 (мм)	Проба Норна (сек.)
Группа I (n=30)	6,6±1,4	3,8±1,1
Группа II (n=30)	5,3±0,9	3,1±0,9

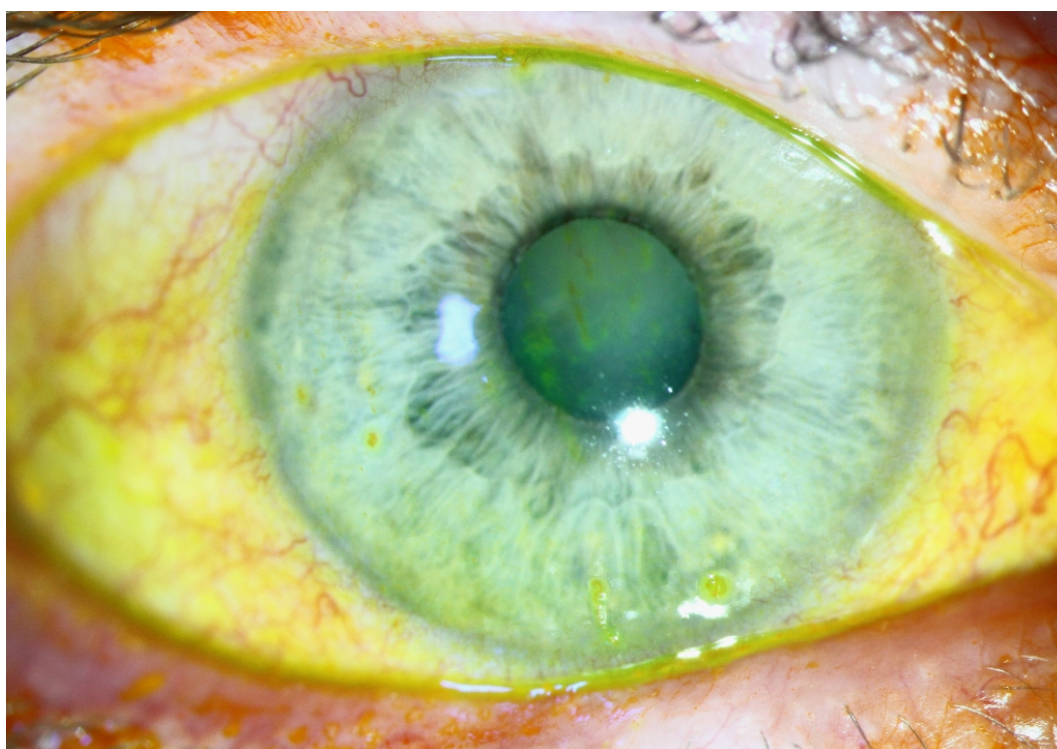


Рисунок 15 – Пациент М., I группа исследования, биомикроскопия роговицы, окрашивание флюоресцеином. Состояние до начала терапии

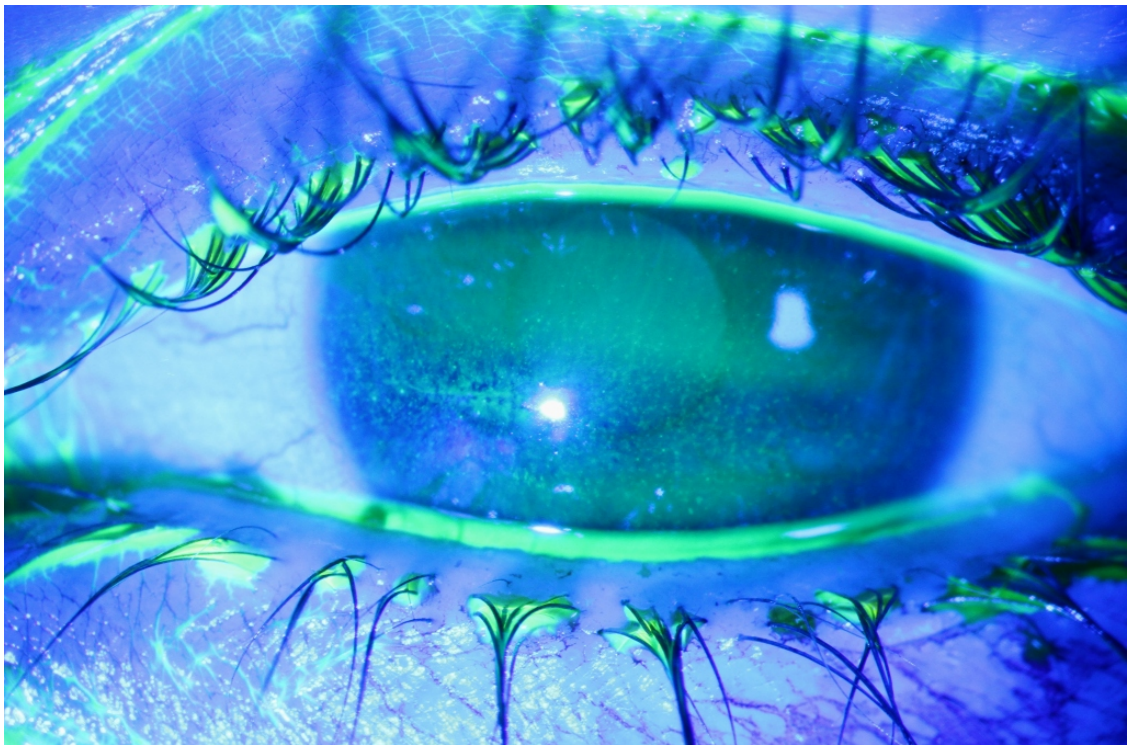


Рисунок 16 – Пациент К., II группа исследования, биомикроскопия роговицы, окрашивание флюоресцеином. Состояние до начала терапии

3.5.2. Результаты лабораторной диагностики пациентов, включенных в исследование

Всем 60 пациентам, включенным в группы исследования, проводился иммуноферментный анализ крови (ИФА) к ВПГ 1, 2 типов и цитомегаловирусу и исследование ПЦР-материала с конъюнктивы. При оценке результатов диагностики уделялось внимание анализу соотношения показателей ВПГ 1, 2 типов и цитомегаловируса.

При проведении исследования у 51 пациента из 60 (85% случаев) отмечалось сочетание герпетической и цитомегаловирусной инфекции. У 21 пациента (35% случаев) выявлено превышение показателей ЦМВ над ВПГ 1, 2 типов. Наличие превышения показателей ЦМВ по отношению к ВПГ-1, 2 в 2 раза выявлено у 10 пациентов (16,7% случаев), в 4 раза – у 9 пациентов (15% случаев), превышение показателей в 8 раз (3,3% случаев) наблюдалось у 2 пациентов. У 5 пациентов из 60 были получены положительные титры Ig M к цитомегаловирусу (8,3% случаев). Положительные титры Ig G лишь к

цитомегаловирусу были выявлены у 9 пациентов (15% случаев). Равные значения титров ВПГ и ЦМВ показали результаты ИФА у 9 пациентов (15% случаев). Учитывалось, что наличие титров ЦМВ или ВПГ даже в высоких единицах не считается доказательством вирусной этиологии хронических нарушений эпителизации роговицы у обследованных пациентов. Оценка данных результатов ИФА крови пациентов представлена в таблице 10.

Исследование ПЦР-материала с конъюнктивы показало инфицирование всех пациентов, включенных в исследование. Распределение процентов нахождения возбудителя указано выше в пункте 3.1.2.

Таблица 10 – Варианты сочетания титров герпетической и цитомегаловирусной инфекции у пациентов с герпетическими кератоконъюнктивитами (n=51), М (%)

Отношение показателей ВПГ IgG / ЦМВ IgG	Число случаев	%
2	10	16,7
4	11	18,3
8	3	5,0
1 (равны)	9	15,0
0,0625 (меньше в 16 раз)	1	1,7
0,125 (меньше в 8 раз)	2	3,3
0,25 (меньше в 4 раза)	5	8,3
0,5 (меньше в 2 раза)	10	16,7

3.5.3. Динамика результатов восстановления целостности роговицы в сравниваемых группах

Во время проведения курса терапии оценивалось состояние роговицы пациентов на сроках 2 недели с момента начала 1-го (противовирусного) этапа терапии, а также на следующих сроках проведения 2-го этапа терапии: еженедельно с 1-й по 8-ю неделю 2-го этапа терапии, 3 и 6 месяцев после окончания лечения.

Проведение 1-го этапа терапии рассматривалось с одной стороны с лечебной целью, с другой стороны, как профилактическая мера, необходимая

для подготовки ко 2-му этапу, непосредственной целью которого и являлась эпителизация хронического дефекта роговицы. Таким образом, отсутствие динамического улучшения показателей эпителизации роговицы и остроты зрения пациентов на протяжении противовирусного этапа терапии являлось обоснованным.

Методом учета жалоб пациентов и объективной оценки их качества жизни, являлось анкетирование в динамике, на сроках 4, 8 недель и 3 и 6 месяцев от начала 2-го этапа терапии. Максимальное значение оценки соответствовало 16 баллам. Динамическое снижение балльной оценки на фоне проводимой терапии являлось объективным показателем эффективности исследуемых лечебных схем. Статистически обработанные результаты динамики субъективных жалоб пациентов на фоне проводимой терапии представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Сравнительная оценка динамических результатов анкетирования пациентов в зависимости от проводимого лечения (n=60), (M±σ)

Сроки исследования	Группа I (n=30)	Группа II (n=30)
Первичные данные	8,47±1,91	8,27±2,32
4 недели	5,97±1,79*	4,77±2,08*, #, ###
8 недель	3,83±2,07*	3,13±1,78*
3 месяца	3,67±1,97*	2,70±1,56*, ###
6 месяцев	3,33±1,84*	2,53±1,48*, ###

*различие средних достоверно по сравнению с исходными данными в группе (p<0,05);

различие средних в группе I достоверно по сравнению с показателями в группе II в те же сроки наблюдения (p<0,05).

В группе I, получавшей БоТП, и группе II (с БоТП и гликозаминогликанами) наблюдалось максимальное снижение жалоб уже через 4 недели после начала 2-го этапа терапии. Затем отмечалось

дальнейшее улучшение показателей репарации в течение всего срока активного наблюдения, причем даже у тех пациентов, которые прекращали получать БоТП вследствие ранней полной эпителизации роговицы. Таким образом, удалось добиться достоверного снижения уровня жалоб пациентов на фоне проведенной терапии во все сроки, по сравнению с исходными данными в группах исследования. В ходе анализа результатов выявлено достоверное, хотя и не значительное, снижение показателей жалоб пациентов в группе II по сравнению с группой I. Подобные различия сохранялись и в отдаленные сроки после отмены терапии.

Для оценки показателя слезопродукции использовался тест Ширмера-1, который проводили до начала лечения, и затем еженедельно с 1-й по 8-ю неделю 2-го этапа терапии, через 3 и 6 месяцев после окончания лечения. Отмечался равноценный прирост среднего показателя теста Ширмера-1 в группах I и II на фоне проводимого лечения. Максимальное увеличение среднего значения теста Ширмера-1 в группах I и II наблюдалось на сроке 4 недели от начала проведения 2-го этапа терапии. Улучшение показателей теста Ширмера замедлялось после 4-й недели терапии, однако рост среднего значения продолжался. Возможной причиной прироста показателя теста Ширмера-1 может быть описанный в литературе противовоспалительный эффект БоТП, позволяющий компенсировать синдром сухого глаза, присутствующий у пациентов с хроническими поражениями роговицы, в особенности вирусной этиологии. Динамическая оценка показателей теста Ширмера-1 в исследуемых и контрольных группах представлена в таблице 12. Группами контроля I и II служили пациенты исследуемых групп до лечения.

Однако в группах I и II изначально наблюдались различные средние показатели теста Ширмера-1, варьирующие в широких пределах вследствие того, что данное исследование не специфично для рецидивирующих эрозий роговицы. Таким образом, в настоящем исследовании оценка показателя теста Ширмера-1 производилась как одно из дополнительных мероприятий,

направленных лишь на выявление изменений количественного состава слезы у пациентов.

Оценка результатов пробы Норна в динамике не дала стабильных показателей, т.к. полученные результаты не могли являться достоверными, вследствие уменьшения времени разрыва слезной пленки на фоне эпителиальных дефектов разного размера и формы, варьирующихся от пациента к пациенту.

Таблица 12 – Оценка показателей теста Ширмера-1 в исследуемых и контрольных группах (n=60), (M±σ)

Сроки	Группа I (n=30)	Группа II (n=30)
Первичные данные	6,6±1,4	5,3±0,9
1 неделя	6,7±1,4 ###	5,3±0,9
2 недели	6,8±1,4 ###	5,3±0,9
3 недели	6,9±1,5*, #, ###	5,6±1,2*, ##
4 недели	7,5±1,5*, #, ###	6,5±1,6*, ##
6 недель	7,8±1,5*, #, ###	7,0±1,8*, ##
8 недель	8,2±1,6*, #, ###	7,1±1,8*, ##
3 месяца	8,2±1,6*, #, ###	7,1±1,8*, ##
6 месяцев	8,4±1,5*, #, ###	7,1±1,7*, ##

*различие средних достоверно по сравнению с исходными данными в группе (p<0,05);

различие средних достоверно по сравнению с показателями в группе контроля (p<0,05);

различие средних достоверно по сравнению с показателями в группе контроля (p<0,05);

различие средних в группе I достоверно по сравнению с показателями в группе II в те же сроки наблюдения (p<0,05).

Биомикроскопия пациентов проводилась в начале исследования, еженедельно в течение всего исследования и на сроке 3 и 6 месяцев после окончания лечения. Наиболее детально оценивалась динамика состояния пациентов на протяжении периода проведения 2-го этапа терапии, направленного на улучшение показателей эпителизации роговицы. Подобное

внимание определялось необходимостью не только отслеживания результатов эпителизации в сравнении с исходным уровнем, т.е. с контролем, но и оценкой эффективности терапии, проводимой с помощью изолированного использования БотП, или ее сочетания с 0,01% сульфатированными гликозаминогликанами (Баларпан-Н). В ходе проведения биомикроскопии пациентов в группах I и II в динамике наблюдалось постепенное снижение гиперемии тарзальной и бульбарной конъюнктивы, отека и помутнений роговицы, наблюдалась ее постепенная эпителизация. Для примера, на рис. 17 и 18 показано значительное улучшение состояния роговицы пациентов из исследуемых групп (те же пациенты представлены на рис. 15 и 16).

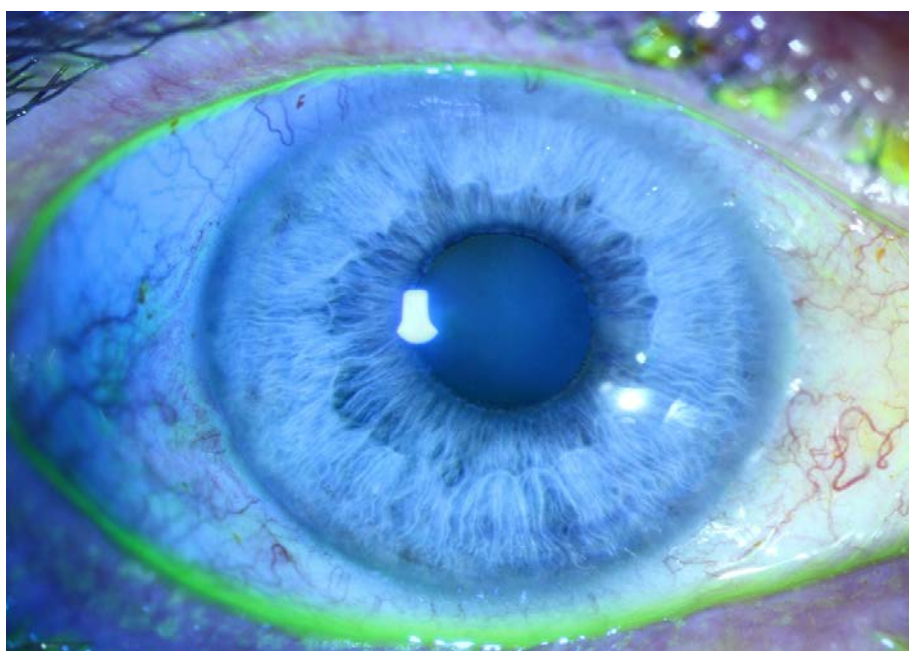


Рисунок 17 – Пациент М., группа I, биомикроскопия роговицы, окрашивание флюоресцеином. Состояние через 8 недель проведенной терапии (клиническая картина до начала лечения представлена на рис. 15)

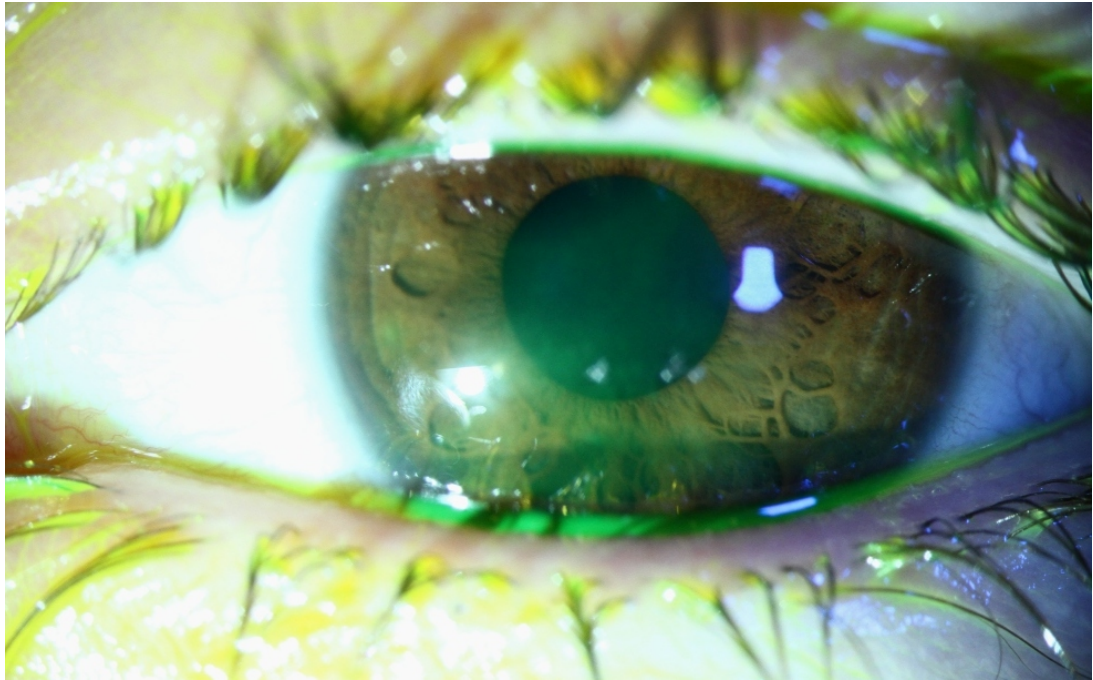


Рисунок 18 – Пациент К., группа II, биомикроскопия роговицы, окрашивание флюоресцеином. Состояние через 4 недели терапии (клиническая картина до начала лечения представлена на рис. 16)

В ходе проведения первого противовирусного этапа терапии (до начала изолированного или сочетанного использования БоТП), пациенты получали стандартную репаративную терапию, включавшую препараты различной степени вязкости. На этом этапе (первые 2 недели исследования) наблюдалась лишь кратковременная слабоположительная динамика, не влиявшая принципиально на уровень эпителизации эрозированных роговиц.

С началом 2-го этапа репаративной терапии произошли значительные положительные сдвиги в эпителизации эрозированных роговиц. В группе I (изолированное применение БоТП) полная эпителизация через 4 недели терапии БоТП наблюдалась у 11 пациентов (36,6%), в ходе пролонгирования курса терапии БоТП до 8 недель, еще 3 пациента, имевшие прогрессирующее снижение индекса поражения роговицы, получили полную эпителизацию. В группе II (сочетанное применение БоТП с 0,01% сульфатированными гликозаминогликанами) через 4 недели терапии полная эпителизация с

отсутствием окрашивания флюоресцеином наблюдалась у 12 пациентов - 40%, а через 8 недель удалось получить полную эпителизацию еще у 3 пациентов.

У остальных пациентов групп I и II (n=31) наблюдалось снижение значения индекса поражения роговицы, однако достигнуть полной эпителизации с отсутствием прокрашивания флюоресцеином не удалось. Между исследуемыми группами не было замечено достоверных различий среднего индекса поражения роговицы. Оценка динамики снижения среднего индекса поражения роговицы у пациентов, не получивших полную эпителизацию, представлена в таблице 13. Стоит отметить, что использование методики оценки индекса поражения роговицы является важным диагностическим критерием в исследовании, т.к. данная методика позволяет выявить малейшие, порой даже точечные участки дезэпителизации роговицы, что является важным аспектом в диагностике подобных нарушений и позволяет объективно количественно оценить показатели динамики эпителизации роговицы.

Таблица 13 – Динамика снижения индекса поражения роговицы у пациентов групп I и II без полной эпителизации роговицы (n=31), (M±σ)

Сроки исследования	Группа I (n=16)	Группа II (n=15)
Первичные данные	7,0±1,5	7,0±1,8
1 неделя	6,9±1,5	6,7±1,6*
2 недели	6,2±1,2*	6,3±1,5*
3 недели	5,8±1,3*	5,7±1,5*
4 недели	5,3±1,0*	5,3±1,5*
6 недель	4,5±0,9*	4,5±1,2*
8 недель	4,0±0,9*	3,9±1,3*

*различие средних достоверно по сравнению с исходными данными в группе (p<0,05);

различие средних в группе I достоверно по сравнению с показателями в группе II в те же сроки наблюдения (p<0,05).

Терапия БоТП у всех пациентов была завершена через 8 недель от ее начала, а мониторинг состояния роговицы проводился до 6 месяцев от начала лечения. Через 6 месяцев от начала терапии наблюдалось по 1 рецидиву заболевания в каждой группе исследования. Таким образом, в ходе проведения сравнительного анализа был показан положительный эффект предложенных методик у пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы герпетической этиологии.

В ходе анализа полученных результатов не было замечено достоверных различий показателей среднего индекса поражения роговицы между исследуемыми группами. Таким образом, было продемонстрировано относительно равноценное улучшение показателей роговицы в группах I и II ($p \leq 0,05$), а также низкий процент рецидивов, в отличие от стандартных методов терапии (рис. 19). Сравнительная оценка индекса поражения роговицы, показавшая достоверное улучшение показателей эпителизации, представлена в таблице 14.

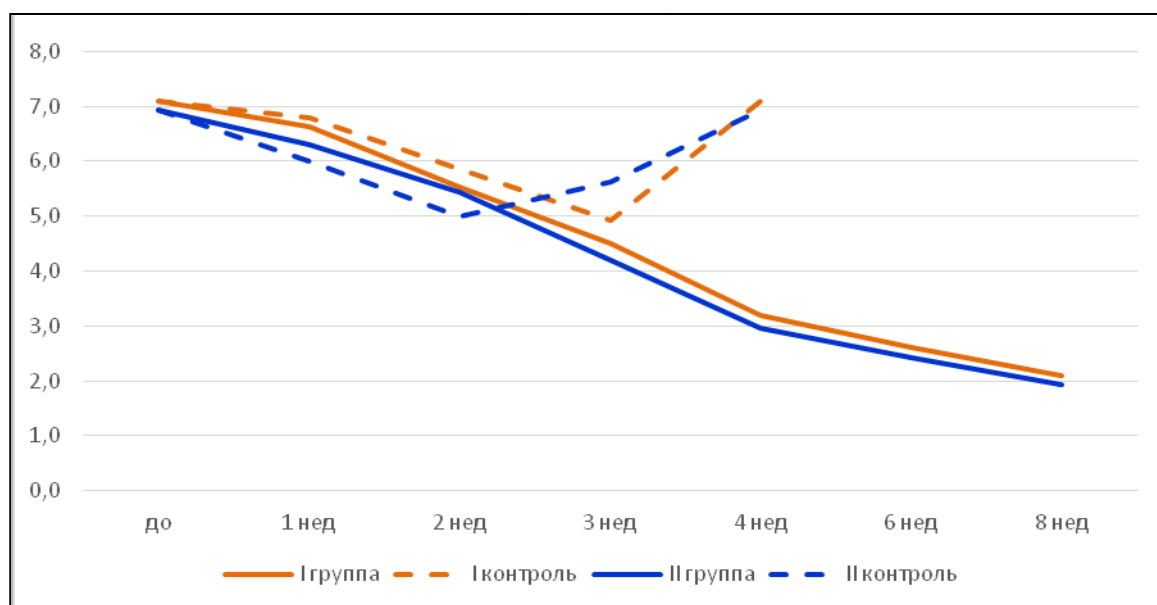


Рисунок 19 – Динамика изменения индекса поражения роговицы в исследуемых группах (в баллах)

Таблица 14 – Динамика индекса поражения роговицы в ходе проведенного лечения в группах (n=60), (M±σ)

Сроки исследования	Группа I (n=30)	Группа II (n=30)
Первичные данные	7,1±1,9	6,9±1,8
1 неделя	6,6±1,8*	6,3±1,6*
2 недели	5,5±1,6*	5,4±1,6*
3 недели	4,5±2,0*	4,2±2,1*,##
4 недели	3,2±2,6*,#	3,0±2,7*,##
6 недель	2,6±2,3*	2,4±2,3*
8 недель	2,1±2,1*	1,9±2,2*

*различие средних достоверно по сравнению с исходными данными в группе (p<0,05);

различие средних достоверно по сравнению с показателями в группе контроля (p<0,05);

различие средних достоверно по сравнению с показателями в группе контроля (p<0,05);

различие средних в группе I достоверно по сравнению с показателями в группе II в те же сроки наблюдения (p<0,05).

Динамический осмотр пациентов, включенных в исследование, с выполнением окрашивания флюоресцеином выявил равноценное, максимальное снижение индекса поражения роговицы в группах I и II уже через 4 недели терапии. При этом уменьшение показателей индекса поражения роговицы наблюдалось в течение каждой недели.

Ввиду того, что пациенты, включенные в исследование, имели различную рефракцию и, соответственно, некорригированная ОЗ не имела информативности, были использованы значения максимальной КОЗ пациентов. Оценка КОЗ в группах I и II производилась на сроках 1, 2, 3, 4, 6 и 8 недель, а также через 3 и 6 месяцев после начала терапии.

На фоне проводимого лечения в группах I и II наблюдалось равноценное увеличение показателей КОЗ на сроках с 3-4-й недели от момента начала 2-го этапа терапии. Эти данные совпадали со сроками значимого снижения среднего индекса поражения роговицы в исследуемых группах. Наиболее значительное увеличение КОЗ в группах I и II отмечалось

на сроке 8 недель от момента проведения 2-го этапа терапии. При этом в отдаленные сроки значения КОЗ пациентов групп I и II стабильно сохранялись на протяжении срока наблюдения. Динамика изменения КОЗ пациентов на фоне проведенной терапии представлена в таблице 15.

Таблица 15 – Динамика изменения корригированной остроты зрения пациентов групп I и II на фоне проводимой терапии (n=60), (M±σ)

Сроки исследования	Группа I (n=30)	Группа II (n=30)
Первичные данные	0,4±0,2	0,4±0,2
1 неделя	0,4±0,2	0,4±0,2
2 недели	0,4±0,2	0,4±0,2
3 недели	0,5±0,2	0,5±0,2
4 недели	0,5±0,3*	0,5±0,3*
6 недель	0,6±0,3*	0,6±0,3*
8 недель	0,7±0,3*	0,6±0,3*
3 месяца	0,7±0,3 #	0,6±0,3 #
6 месяцев	0,7±0,2 #	0,6±0,2 #

*различие средних достоверно по сравнению с данными в группах контроля (p<0,05);

различие средних достоверно по сравнению с показателями в исследуемых группах до начала терапии (p<0,05).

3.5.4. Осложнения, возникшие в ходе проведения клинической части исследования

В ходе отбора пациентов для проведения настоящего исследования, на начальном этапе была выявлена аллергическая реакция при закапывании 5% Декспантенола (Корнерегель) у 3 пациентов, и у 2 пациентов – аллергическая реакция на инстилляцию 0,01% сульфатированных гликозаминогликанов (Баларпан-Н). Реакция проявлялась в виде жалоб пациентов на усиление покраснения глаза, а также чувство жжения и зуда, возникавшее сразу после закапывания вышеперечисленных препаратов. При биомикроскопии выявлялась более выраженная, чем на момент первичного осмотра, гиперемия конъюнктивы, а также ярко выраженная фолликулярная реакция

тарзальной и бульбарной конъюнктивы, что являлось прямым показанием для смены схемы терапии на альтернативную и исключения их из клинического исследования.

Инстилляции аутологичной богатой тромбоцитами плазмы ни у одного пациента не вызвали ни аллергических, ни токсических реакций.

3.5.5. Дальнейшая тактика ведения пациентов без полной эпителизации роговицы

В результате проведенной терапии инстилляциями БоТП в рамках данного исследования удалось добиться полной эпителизации у 36,6% пациентов в группе I, в группе II – у 40% пациентов. У остальных пациентов, включенных в группы I и II также наблюдалась положительная динамика и снижение индекса поражения роговицы до значений $4,0 \pm 0,9$ и $3,9 \pm 1,3$ баллов соответственно (см. таблица 13). Возникал вопрос дальнейшей тактики их ведения.

У 7 пациентов было принято решение о применении по истечении сроков исследования бандажных мягких контактных линз в сочетании с продолжением репаративной терапии. Смена бандажной линзы производилась 1 раз в неделю с включением в терапию инстилляций препарата Пиклоксидин 4 раза в день на линзу. В 1 случае была проведена фототерапевтическая кератотомия с положительной динамикой. Остальные пациенты были оставлены на постоянной интенсивной терапии вязкими слезозаместителями и гелями-репарантами.

Несмотря на отсутствие у части пациентов полной эпителизации, наблюдающееся динамическое снижение среднего индекса поражения роговицы и после отмены терапии может свидетельствовать о значительном противовоспалительном эффекте БоТП, пролонгирующем эффект репаративных лечебных средств.

Таким образом, применение инстилляций аутологичной богатой тромбоцитами плазмы в течение 8 недель привело к полной эпителизации

примерно в 30% случаев хронических эрозий роговицы, и в значительной степени снизило индекс поражения роговицы у остальных пациентов. При сроке наблюдения 6 месяцев только у 2 пациентов из 60 произошло ухудшение состояния с повторным образованием стойкого дефекта эпителия роговицы. При этом сравнительное исследование применения отдельно БоТП и комбинации БоТП с гликозаминогликанами не показало достоверно значительной разницы в эффективности репарации хронических нарушений эпителизации роговицы. Однако немаловажным является тот факт, что субъективные жалобы пациентов были ниже в группе, получавшей БоТП и гликозаминогликаны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эрозии роговицы характеризуются длительным воспалительным процессом и затяжным течением. Пусковым механизмом развития данной группы заболеваний является нарушение адгезии эпителия роговицы к подлежащей Боуменовой мембране. Рецидивирующая эрозия роговицы к настоящему времени выделена как самостоятельное заболевание, а герпетическая этиология занимает в данной группе патологий значительное место [21, 34, 47, 133, 139].

Герпетическая природа хронических нарушений эпителизации роговицы встречается в практике достаточно часто. Однако традиционно они считаются вызванными ВПГ 1, 2 типов инфицированием, в то время как все больше исследователей рассматривают именно хроническое поражение как следствие сочетанной герпесвирусной инфекции [58, 151].

В качестве методов терапии герпетических хронических нарушений эпителизации используют: репаративные препараты и слезозаместители, бандажные МКЛ [47, 141, 156]. Среди хирургических методов лечения возможно проведение фототерапевтической кератэктомии, а также использование покровных материалов [91]. Однако применение классических терапевтических методик зачастую не приводит к получению полной эпителизации роговицы, либо полученный эффект носит весьма кратковременный характер.

Уже более 20 лет для усиления репарации роговицы успешно применяются компоненты крови, и наиболее часто – аутологичная сыворотка [44, 45], используемая в виде подкожно-конъюнктивальных инъекций и в виде капель. Следующим этапом развития методики применения аутокрови стало использование аутологичной БоТП [155]. Проведенные клинические исследования показали эффективность применения БоТП для лечения синдрома сухого глаза тяжелой степени, ожоговой болезни, сопровождающихся клинической картиной хронических нарушений

эпителизации роговицы. При приготовлении БоТП достигается получение высоких концентраций факторов роста, присутствующих в α -гранулах тромбоцитов: эпителиального, фактора роста фибробластов, трансформирующего фактора роста- β , тромбоцитарного и инсулиноподобного факторов роста [63, 64].

Однако до настоящего времени не был разработан алгоритм ведения пациентов с герпесвирусными эрозиями роговицы с использованием специфической противовирусной терапии и аутологичной БоТП. Кроме того, отсутствовало описание возможных вариантов течения клинической картины сочетанной герпетической инфекции, что дало бы основу для принятия решения об эмпирическом назначении специфической противовирусной терапии. Недостаток информации об особенностях клинических проявлений цитомегаловирусных хронических нарушений целостности роговицы и необходимость разработать технологию для лечения данной патологии с помощью аутологичной богатой тромбоцитами плазмы и стали основанием для проведения настоящего исследования.

Цель работы – разработать технологию лечения хронических нарушений эпителизации роговицы герпесвирусной этиологии с помощью изолированного и сочетанного применения богатой тромбоцитами плазмы и 0,01% сульфатированных гликозаминогликанов.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи исследования**: оценить частоту формирования хронических нарушений эпителизации в зависимости от характера вирусной этиологии, а также исследовать характер и частоту встречаемости сопутствующей вторичной бактериальной инфекции; проанализировать стерильность приготовленной богатой тромбоцитами плазмы; разработать этапную методику терапии хронических нарушений эпителизации роговицы герпесвирусной этиологии с помощью изолированного и сочетанного применения богатой тромбоцитами плазмы и 0,01% сульфатированных гликозаминогликанов и оценить ее клиническую эффективность.

В качестве двух этипатогенетических составляющих в настоящем исследовании прицельно рассматривались вирус простого герпеса и цитомегаловирус. Подобный выбор двух представителей семейства герпетических вирусов из 8 известных на сегодняшний день основывался на том, что ВПГ является наиболее часто встречающейся причиной герпетического кератита и, как известно, обладает эпителио-нейротропностью, тогда как ЦМВ менее известен как вирусная причина поражения роговицы, обладающий при этом лимфоцитотропными свойствами [57].

Исследование включало три основных этапа: лабораторный, экспериментальный и сравнительный клинический.

В исследование были включены 120 пациентов (62 мужчины, 58 женщин в возрасте 18-75 лет) со следующими условиями: наличие рецидивирующего кератита, наличие хронической деэпителизации роговицы больше 2 недель без выраженной положительной динамики, положительные титры ИФА крови к антителам к ЦМВ.

Задачей первого этапа работы была систематизация и описание характера клинических проявлений хронических поражений роговицы у пациентов с цитомегаловирусным инфицированием. Кроме того, ставилась задача – оценить наличие и вариации вторичного бактериального инфицирования у пациентов с цитомегаловирусным поражением, а также качественное и количественное инфицирование этих пациентов вирусом простого герпеса.

У 104 пациентов (86,7%) было выявлено сочетание герпетической и цитомегаловирусной инфекции, у 9 пациентов (7,5%) определялось сочетание как положительного Ig M, так и положительного Ig G к ЦМВ. Наличие изолированного ЦМВ было выявлено у 16 пациентов (13,3%). Среди пациентов с сочетанной герпетической и цитомегаловирусной инфекцией равное соотношение титров наблюдалось у 20 пациентов (16,7%). Увеличение Ig G к ЦМВ по сравнению с ВПГ 1, 2 типов в 2 раза наблюдалось

у 25 пациентов (20,8%), в 4 раза – у 18 пациентов (15%), в 8 раз – у 4 пациентов (3,3%). Превышение показателей ВПГ IgG над ЦМВ в 16 раз выявлено у 2 пациентов (1,7%), в 8 и 4 раза – по 5 пациентов (4,2%), в 2 раза – у 25 пациентов (20,8%).

В процессе исследования у всех 120 пациентов проводился качественный анализ ПЦР-материала с конъюнктивы на наличие ВПГ-1, 2 и ЦМВ. Положительный результат наблюдался у 66 пациентов, сочетание ВПГ-1, 2 и ЦМВ-инфекции наблюдалось у 37 пациентов, изолированная ВПГ-1, 2 инфекция – у 25 пациентов, ЦМВ – у 4 пациентов. Присутствие сочетания как ВПГ, так и ЦМВ у пациентов позволило сделать вывод о необходимости включения противовирусных препаратов широкого спектра действия в схемы рекомендуемой терапии у всех пациентов с хроническими нарушениями эпителизации.

В результате были отобраны 83 пациента, у которых наблюдалась либо изолированная цитомегаловирусная инфекция (n=16), либо равная (n=20) или превалирующая в соотношении с ВПГ-1, 2 (n=47). На основании лабораторных и клинических данных был сделан вывод о вероятной этиологической причастности цитомегаловируса к хроническим нарушениям эпителизации роговицы. В ходе наблюдения данной группы пациентов было проведено описательное исследование особенностей клинической картины возможных вариантов течения сочетанной герпетической и цитомегаловирусной инфекции.

В качестве особенностей, выявляемых у пациентов с рецидивирующими формами поражения предположительно цитомегаловирусной этиологии, удалось выделить:

- наличие одновременно несколько участков поражения, часто коррелирующих с количеством рецидивов заболевания в анамнезе (71% случаев),
- поражение всех секторов роговицы в равной степени (28% случаев),

- преимущественно поверхностное поражение роговицы, чаще не глубже эпителия, однако с возможным отеком эндотелия в той же зоне (58% случаев),

- развитие первичного воспаления в глубоких слоях эпителия, причем образование эрозии не обязательно и скорее вторично (36% случаев),

- достаточно частое отложение пигмента в эпителизированной зоне поражения (44% случаев),

- формирование неоваскуляризации по типу одного или нескольких агрессивных крупных центральных сосудов, проходящих в зону поражения (84% случаев).

В настоящий момент в литературе описано цитомегаловирусное поражение, протекающее на роговице в виде эндотелиита, и отсутствует исследование, посвященное вариантам клинической картины при хронических нарушениях эпителизации роговицы, обусловленных сочетанием вирусов герпеса 1, 2 типов и цитомегаловируса [58, 61, 74]. Полученные результаты, подтвержденные ИФА и качественным ПЦР-исследованиями, свидетельствуют об участии цитомегаловируса в формировании хронических нарушений эпителизации роговицы.

По результатам оценки микробиологического исследования отделяемого конъюнктивы, условно-патогенная и патогенная микрофлора были выявлены у 29 пациентов (24,2% случаев). При этом у 23 пациентов (19,2% случаев) был выделен *Staphylococcus epidermidis*, у 4 пациентов (3,3% случаев) – *Staphylococcus aureus*, у 2 пациентов (1,7%) – *Enterococcus faecalis*. Нахождение в почти $\frac{1}{4}$ части случаев микрофлоры в дальнейшем обусловило включение первым этапом антибактериальных препаратов в предложенные схемы эмпирической терапии.

К настоящему времени в литературе не было найдено исследований, посвященных анализу вторичной бактериальной инфекции у пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы герпесвирусной этиологии.

Целью экспериментальной части являлась оценка сохранения стерильности приготовленной БоТП для обоснования оптимальных сроков его применения. Экспериментальное исследование с целью определения бактериальной и грибковой микрофлоры проводилось на 10 образцах БоТП пациентов. Контаминация оценивалась в различные сроки: сразу после получения материала, и через 3, 5, 6 и 7 суток после приготовления препарата при условии хранения материала при температуре $+4-+6^{\circ}\text{C}$. При хранении при -18°C исследование микрофлоры происходило на 14-й, 30-й, 45-й и 60-й день после приготовления препарата.

Не было выявлено контаминации бактериальной или грибковой микрофлорой ни сразу после приготовления богатой тромбоцитами плазмы, ни на сроках 3-и, 5-е, 6-е, и 7-е сутки от момента забора материала при хранении при температуре $+4-+6^{\circ}\text{C}$. При хранении препарата в условиях -18°C показано отсутствие контаминации на сроках 15 дней, 1 месяц и 45 дней во всех 10 образцах, однако на сроке хранения 2 месяца был отмечен рост бактериальной микрофлоры в 1 из образцов, остальные 9 оставались стерильными.

Данная часть исследования была проведена с целью разработки и оптимизации схемы терапии с включением БоТП. Полученные результаты свидетельствуют о безопасном использовании БоТП в течение минимум 4 суток при температуре $+4-+6^{\circ}\text{C}$ и минимум 1 месяца с момента проведения процедуры его получения при хранении в условиях -18°C . На основании результатов данного исследования в дальнейшем пациенту выдавался 1 пузырек капель для немедленного использования и хранения при температуре $+4-+6^{\circ}\text{C}$, остальные пузырьки хранились при -18°C и использовались по мере необходимости. Капли, хранимые при температуре $+4-+6^{\circ}\text{C}$, использовались пациентом не больше 4 суток от момента начала использования.

Следующим шагом по результатам проведенного исследования, была разработана двух этапная методика терапии хронических нарушений

эпителизации роговицы герпесвирусной этиологии. При этом первый этап может расцениваться и как лечебный, и как профилактический в нейтрализации герпетической и цитомегаловирусной составляющей при подготовке к следующему этапу. Учитывая выявленную частоту встречаемости ЦМВ-инфицирования, целесообразно включать в схемы лечения препараты широкого противовирусного спектра, типа валацикловира или ганцикловира.

Учитывая данные проведенного микробиологического исследования, можно рекомендовать использование антибактериальной терапии с целью профилактики, либо лечения вторичного бактериального инфицирования.

Второй этап терапии с включением БоТП направлен непосредственно на улучшение эпителизации при хронических нарушениях эпителизации роговицы. Предложенная методика терапии в дальнейшем использовалась в следующем сравнительном клиническом исследовании.

В настоящее время в клиническую практику внедрен алгоритм применения БоТП для лечения пациентов с синдромом сухого глаза различной этиологии, в том числе и после рефракционной хирургии [62, 63]. Однако не существует разработанного алгоритма ведения пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы герпесвирусной этиологии.

Целью клинического исследования было определить эффективность применения аутологичной богатой тромбоцитами плазмы в терапии хронических нарушений эпителизации роговицы герпетической этиологии. Для этого были отобраны 60 пациентов (60 глаз) с хроническими эрозиями роговицы из 120 обследованных ранее. Условием включения в исследование было наличие персистирующего нарушения целостности эпителизации роговицы в течение минимум 2 недель и отсутствие значительной положительной динамики. Таким образом, контрольной группой в исследовании выступали те же пациенты, получавшие репаративное лечение без существенного улучшения.

При проведении терапии хронических и рецидивирующих эрозий роговицы применение БотП производится одновременно с использованием других репаративных препаратов и протекторов роговицы. Естественно встает вопрос о возможности минимизации инстилляций капель. Второй целью данного клинического исследования эффективности БотП было оценить возможность уменьшения количества используемых пациентом препаратов. Для этого было проведено исследование сравнительной эффективности изолированного применения БотП и инстилляций БотП совместно с 0,01% сульфатированными гликозаминогликанами.

Соответственно, дизайн клинического исследования был следующий: в качестве контрольной группы выступали пациенты (60 глаз) до начала терапией БотП. Первым этапом всем 60 проводилась противовирусная и антибактериальная терапия. Затем все пациенты делились на две группы по 30 человек: 1-й группе была назначена изолированно БотП, 2-й группе – БотП вместе с 0,01% сульфатированными гликозаминогликанами. В течение 8 недель проводимой терапии и затем 6 месяцев после начала терапии оценивалась эпителизация роговицы и состояние глазной поверхности. Таким образом, в одном эксперименте можно было оценить сразу два параметра: 1) эффект терапии БотП в сравнении с исходным уровнем, 2) необходимость сочетанного применения гликозаминогликанов с БотП.

На 1-м этапе предложенной терапии в течение 14 дней обе группы исследования получали одинаковую терапию: Ганцикловир 0,15% (Зирган) 5 раз в день 14 дней, 3 раза в день 7 дней; Левофлоксацин 0,5% (Офтаквикс) 4 раза в день 7 дней; Декспантенол 5% (Корнерегель) 4 раза в день; Натрия гиалуронат 0,3% (Визмед-гель) на ночь 14 дней; Валцикловир 500 мг (Валтрекс) 4 раза в день 7 дней, затем 2 раза в день 7 дней.

Подобная терапия включала в себя стандартные средства, применяемые с репаративными целями. Выбор антибактериальных и противовирусных препаратов был обусловлен предыдущим исследованием, показавшим большой процент выявления сочетанного инфицирования разными видами

герпеса и бактериями. Кроме того, применение аутосыыворотки пациентов, зараженных вирусом герпеса требовало предварительной системной терапии герпеса с профилактическими целями.

Через 14 дней, на 2-м этапе: группа I, включавшая 30 пациентов (30 глаз), получала: БоТП 6 раз в день; Декспантенол 5% (Корнерегель) 4 раза в день; Натрия гиалуронат 0,3% (Визмед-гель) на ночь; Валцикловир (Валтрекс) 2 раза в день 7 дней; группа II получала идентичную терапию в сочетании с инстилляциями 0,01% сульфатированных гликозаминогликанов (Баларпан-Н) 4 раза в день. Группы исследования I и II на 2-м этапе дополнительно получали субконъюнктивальные инъекции свежеполученной 0,5 мл БоТП 1 раз в неделю. Длительность 2-го этапа терапии составляла от 4 до 8 недель.

Первые 2 недели, в течение первого (противовирусного) этапа терапии, пациенты не показали значимых изменений, наблюдалась кратковременная слабopоложительная динамика.

Проведение биомикроскопии пациентов групп I и II в динамике в течение 2-го этапа терапии показало постепенное, прогрессирующее снижение гиперемии и отека тарзальной и бульбарной конъюнктивы, эпителизацию роговицы.

После начала 2-го этапа терапии, проведение оценки клинико-функциональных показателей в динамике показало равномерное уменьшение среднего индекса поражения роговицы в обеих исследуемых группах. Значения индекса поражения роговицы до начала лечения в группах I и II находились в пределах $7,1 \pm 1,9$ и $6,9 \pm 1,8$ баллов соответственно. В процессе лечения удалось добиться снижения показателя индекса поражения роговицы до значений $2,1 \pm 2,1$ и $1,9 \pm 2,2$ баллов.

Полученные отдаленные результаты исследования групп I и II показали градиентное снижение индекса поражения роговицы, продолжавшееся и после отмены терапии. Данные результаты косвенно подтверждали наличие противовоспалительного эффекта БоТП, описанного в литературе.

В группе I полная эпителизация через 4 недели с момента начала 2-го этапа терапии наблюдалась у 11 пациентов (36,6%), через 8 недель – у 14 пациентов (46,7%). В группе II 12 пациентов (40%) показали полную эпителизацию роговицы через 4 недели, а через 8 недель терапии их количество увеличилось до 15 пациентов (50%).

Кроме того, среди пациентов групп I и II, не получивших полную эпителизацию роговицы (n=31), наблюдалось снижение показателя среднего индекса поражения роговицы от $7,0 \pm 1,5$ и $7,0 \pm 1,8$ баллов до $4,0 \pm 0,9$ и $3,9 \pm 1,3$ баллов соответственно. В отдаленном периоде наблюдения (на сроке до 6 месяцев) только у 1 пациента в каждой группе развилось повторное стойкое нарушение эпителизации.

Данные анкетирования в динамике показали значительное снижение жалоб уже через 4 недели после начала 2-го этапа терапии. Так, до начала применения предложенной методики, средние значения находились в пределах $8,47 \pm 1,91$ и $8,27 \pm 2,32$ баллов в исследуемых группах I и II, через 4 недели наблюдалось статистически значимое снижение показателей до значений $5,97 \pm 1,79$ и $4,77 \pm 2,08$ баллов. В дальнейшем продолжало наблюдаться достоверное снижение средних значений по данным анкетирования в исследуемых группах. Данные различия сохранялись и в отдаленные сроки после отмены терапии.

Проведение дополнительного исследования – теста Ширмера-1 в динамике, показало равноценное увеличение показателей пациентов исследуемых групп I и II на фоне проведенной терапии. Первоначально, средние значения теста Ширмера-1 в группах составляли $6,6 \pm 1,4$ и $5,3 \pm 0,9$ мм. Спустя 4 недели от начала 2-го этапа терапии наблюдали максимальное увеличение среднего значения в исследуемых группах до $7,5 \pm 1,5$ и $6,5 \pm 1,6$ мм, а через 8 недель показатель составил $8,2 \pm 1,6$ и $7,1 \pm 1,8$ мм.

В исследуемых группах I и II наблюдалось равномерное увеличение показателей КОЗ, начиная с 3-4-й недели терапии. Период увеличения показателей КОЗ совпадал со снижением среднего индекса поражения

роговицы в исследуемых группах. Максимальное увеличение КОЗ в группах наблюдалось спустя 8 недель, от $0,4 \pm 0,2$ в группах I и II до $0,7 \pm 0,3$ и $0,6 \pm 0,3$ соответственно.

Данная схема терапии в исследуемых группах имела хорошую переносимость, не сопровождалась явлениями токсико-аллергических реакций на фоне применения БоТП.

Эффективность применения БоТП в сравнении с группой контроля (пациенты до начала лечения) показала почти 50-процентную эффективность в эпителизации состояний, которые ранее не поддавались традиционной терапии. У остальных пациентов наблюдалось стойкое улучшение состояния роговицы, стабильное в течение 6 месяцев.

Сравнительное исследование применения БоТП изолированно и в сочетании с сульфатированными гликозаминогликанами показало отсутствие значимой разницы в сроках эпителизации между двумя группами. Однако уровень комфорта пациентов был выше при применении сочетанной терапии.

Предложенный метод лечения способствует сокращению сроков эпителизации роговицы, что обусловлено, главным образом, наличием повышенного содержания факторов роста в аутологичной богатой тромбоцитами плазме. Начальный этап применения методики подразумевает проведение субконъюнктивальной инъекции БоТП, таким образом запуская процесс эпителизации, параллельно пациент продолжает использование аутологичной БоТП в виде инстилляций 6 раз в день. Известно, что тромбоциты, содержащие в своих α -гранулах трофические факторы, следует хранить при температуре $+22^{\circ}\text{C}$, а при более низком режиме хранения происходит их разрушение, в связи с чем, на этапе применения методики, при хранении в предложенных условиях ($+4$ - $+6^{\circ}\text{C}$ либо -18°C), действующее вещество уже можно назвать лизатом. Однако, несмотря на деструкцию самих тромбоцитов, высвобождающиеся факторы роста при указанных температурных режимах хранения остаются сохранными и по-прежнему положительно влияют на процесс репарации роговицы [64, 105].

В доступной литературе не встречалось сравнительной оценки клинико-функциональных показателей при применении БотП изолированно, либо в сочетании с 0,01% сульфатированными гликозаминогликанами, подобное исследование было произведено впервые.

Таким образом, предложенная этапная технология лечения хронических нарушений эпителизации роговицы герпесвирусной этиологии с применением БотП эффективна и безопасна и может быть рекомендована при неэффективности классической терапии хронических поражений роговицы герпетической этиологии.

ВЫВОДЫ:

1. По результатам проведенного лабораторного исследования пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы на фоне ЦМВ-инфицирования, ИФА крови показало наличие титров ВПГ 1, 2 типов и цитомегаловируса у 86,7% пациентов, изолированное наличие ЦМВ – у 13,3%, превалирование показателей ЦМВ, либо равное количество ВПГ 1, 2 типов и цитомегаловируса – в 55,8% случаев. Данные исследования ПЦР-материала с конъюнктивы у тех же пациентов показали сочетанное поражение ВПГ-1, 2 и ЦМВ в 30,8% случаев, изолированное ВПГ и ЦМВ-поражение – в 20,8 и 3,3% случаев соответственно.

2. Показано наличие сопутствующей вторичной бактериальной инфекции в 24,2% случаев у пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы герпесвирусной этиологии. В 19,2% случаев был выделен *Staphylococcus epidermitis*, в 3,3% случаев – *Staphylococcus aureus*, в 1,7% – *Enterococcus faecalis*. Полученные данные обусловили необходимость применения антибактериальной терапии на 1-м этапе лечения хронических нарушений эпителизации роговицы.

3. Определены сроки безопасного хранения приготовленной БоТП: при хранении при температуре -18°C было доказано отсутствие контаминации до 45 суток, при условии хранения при температуре $+4\text{--}+6^{\circ}\text{C}$ – отсутствие контаминации до 7 суток.

4. За счет применения инстилляций аутологичной БоТП была получена стойкая эпителизация у пациентов с хроническими нарушениями эпителизации в 36,6% случаев через 4 недели и в 46,7% случаев – через 8 недель терапии. Применение БоТП в сочетании с 0,01% сульфатированными гликозаминогликанами привело к эпителизации в 40 и 50% случаев на сроках 4 и 8 недель соответственно. Значения среднего индекса поражения роговицы в результате предложенной терапии снизились с $7,1 \pm 1,9$ и $6,9 \pm 1,8$

баллов до $2,1 \pm 2,1$ и $1,9 \pm 2,2$ баллов. При применении БоТП вместе с гликозаминогликанами пациенты отмечали на 24% больший уровень комфорта, чем при изолированном применении БоТП.

5. Предложенная этапная методика терапии пациентов с хроническими нарушениями эпителизации роговицы герпесвирусной этиологии, включающая проведение подготовительного этапа антибактериальной и противовирусной терапии, с последующим применением БоТП вторым этапом, показала полное отсутствие токсико-аллергических побочных реакций, своевременное купирование вторичной бактериальной инфекции, отсутствие активации герпесвирусного процесса в течение 6 месяцев и стабильное динамическое улучшение состояния роговицы в ходе лечения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При ведении пациентов с хроническими и рецидивирующими нарушениями эпителизации вирусной этиологии следует либо проводить бактериологическое исследование на предмет возможного вторичного бактериологического инфицирования, либо проводить назначение эмпирической антибактериальной терапии.

2. При нахождении следующих клинических признаков кератитов: наличие одновременно несколько участков поражения, часто коррелирующих с количеством рецидивов заболевания в анамнезе, преимущественно поверхностное поражение роговицы, чаще не глубже эпителия, однако с возможным отеком эндотелия в той же зоне, отложение пигмента в эпителизированной зоне поражения, формирование неоваскуляризации по типу одного или нескольких агрессивных крупных центральных сосудов, проходящих в зону поражения, следует рассматривать ЦМВ-инфицирование как вероятную этиологию заболевания.

3. Учитывая большой процент изолированного поражения ЦМВ и сочетанного поражения ЦМВ и ВПГ 1, 2 типов, в терапию хронических и рецидивирующих поражений роговицы предположительно герпетической этиологии рекомендуется включать препараты широкого противовирусного спектра, типа Валацикловира или Ганцикловира.

4. При применении аутологичной БоТП рекомендуется передавать пациенту 1 флакон с приготовленной БоТП для инстилляций с условием, что он будет храниться при температуре $+4-+6^{\circ}\text{C}$ в течение 4 суток. Другие флаконы передаются пациенту для последующего хранения при температуре -18°C . Срок хранения при температуре -18°C не должен превышать 1 месяц. По мере необходимости пациент размораживает флаконы и использует их не более 4 суток.

5. При назначении терапии пациентам после купирования хронических или рецидивирующих эрозий роговицы следует уделять внимание назначениям, наряду со слезозаместителями и репарантами, вязких «ночных» слезозаместителей для предотвращения адгезии конъюнктивы века к эпителию роговицы в условиях малой подвижности глаза во время сна.

ОСНОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АС – аутологичная сыворотка

БоТП – богатая тромбоцитами плазма

ВВЗ – вирус варицелла-зостер

ВГД – внутриглазное давление

ВПГ – вирус простого герпеса

ВЭБ – вирус Эпштейна-Барр

ГВЧ – герпес-вирус человека

ИФА – иммуноферментный анализ

КОЗ – корригированная острота зрения

ОЗ – острота зрения

ПЦР – полимеразная цепная реакция

сГАГ – сульфатированные гликозаминогликаны

ЦМВ – цитомегаловирус

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреев Д.Ю. и др. Взвесь аутогенных тромбоцитов в местном лечении ишемических трофических язв нижних конечностей // Вестн. хирургии. – 2009. – Т. 168, № 6. – С. 45-48.
2. Анисимов С.И. Основные механизмы протекции тканей с применением сульфатированных гликозаминогликанов. Экспериментальные исследования // Глаукома. – 2007. – № 2. – С. 23-27.
3. Анисимов С.И., Анисимова С.Ю., Пожарицкий М.Д., Ларионов Е.В., Озорнина О.С. Клинический опыт применения препаратов на основе сульфатированных гликозаминогликанов // Глаукома. – 2008. – № 3. – С. 25-28.
4. Анисимова С.Ю., Анисимов С.И., Ларионов Е.В. Хирургия глаукомы XXI // Восток-Прозрение. – М., 2012. – 170 с.
5. Бойко Э.В., Ян А.В., Синявский О.В., Агеев В.С., Ковтун А.В. О применении лазеров среднего инфракрасного диапазона в комплексном лечении гнойных язв роговицы // Рос. офтальмол. журн. – 2009. – Т. 2. – С. 25-29.
6. Бостанджян М.Г., Бикбулатов Р.М., Фадеева Л.Л., Антонова Т.Н., Каспаров А.А., Майчук Ю.Ф. Изучение эффективности действия поливинилпирролидона, поливинилового спирта и их сочетаний с интерфероном при различных проявлениях герпетической инфекции // Вопросы вирусологии. – 1973. – № 2. – С. 211-215.
7. Бровкина А.Ф. Современные аспекты патогенеза и лечения эндокринной офтальмопатии // Вестник РАМН. – 2003. – № 5. – С. 52-54.

8. Волков В.В. О выборе лазера для лечения заболеваний переднего отдела глазного яблока и век // Офтальмол. журн. – 1985. – Т. 280, № 8. – С. 455-459.
9. Ершов Ф.И. Антивирусные препараты. – М.: Медицина, 1998. – 192 с.
10. Ершов Ф.И. Использование иммуномодуляторов при вирусных инфекциях // Антибиотики и химиотерапия. – 2003. – Т. 48. – № 6. – С. 27-32.
11. Животовский Л.Д. Применение ультрафиолетового облучения крови при лечении кератитов // Офтальмол. журн. – 1990. – № 7. – С. 420-423.
12. Зайцева Н.С., Каспаров А.А., Муравьева Т.В. и др. Метод флюоресцирующих антител в диагностике и лечении герпетического кератита // Вестн. офтальмологии. – 1973. – № 6. – С. 48-51.
13. Зайцева Н.С., Муравьева Т.В., Кричевская Г.И. и др. К диагностике увеитов вирусной этиологии // Вестн. офтальмологии. – 1975. – № 6. – С. 32-34.
14. Казакова К.А., Фролов М.А. Санация язвы роговицы с помощью лазерного излучения ближнего ИК-диапазона // Российский общенациональный офтальмологический форум, 8-й: Сб. науч. тр. – 2015. – Т 1. – С. 93-95.
15. Кански Джек Дж. Клиническая офтальмология. Систематизированный подход / Пер. с англ. – М.: Логосфера, 2011. – 944 с.
16. Каспаров А.А. Значение индукторов интерферона в современной противовирусной терапии герпетической болезни глаз // Вестн. офтальмологии. – 1972. – № 2. – С. 63-67.
17. Каспаров А.А. Современные аспекты лечения герпес-вирусного кератита // Клин. офтальмология. – 2000. – № 2. – С. 59-63.
18. Каспаров А.А. Офтальмогерпес. – М.: Медицина, 1994. – 222 с.

19. Каспаров А.А., Каспарова Евг.А. Локальная экспресс-аутоцитокиноterapia (ЛЭАКЦТ) – перспективное направление в противовирусной иммунотерапии заболеваний глаз // Актуальные проблемы инфекционной патологии глаз: Материалы научно-практ. конф. / [Ред. М.Т. Азнабаев]. – Уфа, 1999. – С. 28-30.
20. Каспарова Е.А., Зайцев А.В., Каспарова Евг.А., Марченко Н.Р. Сочетанное применение микродиатермокоагуляции и локальной экспресс – аутоцитокинотерапии в лечении поверхностных инфекционных язв роговицы // Вестн. офтальмологии. – 2012. – Т. 128, № 6. – С. 50-53.
21. Каспарова Е.А., Каспаров А.А., Марченко Н.Р. Рецидивирующая эрозия роговицы: диагностика и лечение // Вестн. офтальмологии. – 2010. –Т. 126, № 5. – С.3-8.
22. Каспарова Евг.А. Современные методы лечения гнойных язв роговицы // Вестн. офтальмологии. – 2016. – Т. 132, № 5. – С. 125-135.
23. Кишкун А.А. Иммунологические и серологические исследования в клинической практике. – М.: ООО «Медицинское информационное агенство», 2006. – 536 с.
24. Кицак В.Я. Вирусные инфекции беременных: патология плода и новорожденного // Кольцово, 2005. – 84 с.
25. Ковалевская М.А., Майчук Д.Ю., Бржеский В.В., Майчук Ю.Ф., Околов И.Н. Синдром «красного глаза»: Практическое руководство для врачей-офтальмологов / Ред. Д.Ю. Майчук – М., 2010. – 108 с.
26. Котелянский Э.О. Микродиатермокоагуляция при гнойных язвах роговой оболочки // Вестн. офтальмологии. – 1952. – № 3. – С. 4-6.
27. Краснов М.М., Каспаров А.А., Воробьева О.К. и др. Полудан в лечении вирусных заболеваний глаз // Вестн. офтальмологии. – 1997. – № 5. – С. 35-39.

28. Кричевская Г.И., Анджелов В.О., Катаргина Л.А. и др. Распространенность и клиническое значение активной цитомегаловирусной инфекции у больных с офтальмопатологией воспалительного характера // Вестн. офтальмологии. – 2000. – Т. 116, № 5. – С. 51-54.
29. Кугушева А.Э., Слепова О.С., Гундорова Р.А. О влиянии герпес-вирусных инфекций на результаты приживления роговичного трансплантата при кератопластике высокого риска // Актуальные вопросы офтальмологии: Всерос. науч. конф. молодых ученых, 7-я: Сб. науч. работ / Под ред. Б.Э. Малюгина. – М.: Офтальмология, 2012. – С. 116-117.
30. Кузнецов В.П. Интерфероны как средство иммуномодуляции // Иммунология. – 1987. – № 4. – С. 30-34.
31. Куничева Г.С., Каспаров А.А., Вильнер Л.М., Зейтленок Н.А. Клинический опыт применения интерферогена при лечении аденовирусных и герпетических поражениях глаз // Вестн. офтальмологии – 1966. – № 6. – С. 17-20.
32. Куничева Г.С., Каспаров А.А., Вильнер Л.М., Зейтленок Н.А. Клинический опыт применения интерферогена при лечении аденовирусных и герпетических поражениях глаз // Вестн. офтальмологии. – 1966. – № 6. – С. 17-20.
33. Майчук Д.Ю. Рецидивирующие эрозии роговицы: особенности возникновения и лечения // Новое в офтальмологии. – 2014. – № 3. – С. 72-75.
34. Майчук Д.Ю. Эрозии роговицы: клинические формы, новые методы лечения // Клин. офтальмология. – 2004. – № 1. – С. 17.
35. Майчук Ю.Ф. Вирусные заболевания глаз. – М.: Медицина, 1981. – 271 с.
36. Майчук Ю.Ф. Глазные инфекции // РМЖ. – 1999. – № 1. – С. 7-9.
37. Майчук Ю.Ф. Офтальмоферон. – М., 2012. – 125 с.

38. Майчук Ю.Ф. Офтальмоферон. Первые стабильные глазные капли для лечения герпесвирусных и аденовирусных заболеваний глаз. – М, 2004. – 37 с.
39. Майчук Ю.Ф. Клинические формы и лечение кератитов, вызываемых вирусом варицелла зостер // Вестн. офтальмологии. – 2003. – № 6. – С. 35-38.
40. Майчук Ю.Ф. Оптимизация фармакотерапии воспалительных болезней глазной поверхности // Рос. офтальмол. журн. – 2008 – № 3. – С. 18-25.
41. Мальханов В.Б. Офтальмогерпес хронического течения: Автореф. дис. ... д-ра. мед. наук: 14.00.08; [Место защиты: Самарский государственный медицинский университет]. – Самара, 1997. – 48 с.
42. Митягина О.Н., Павлюк А.С. Влияние иммуномодулятора «полудана» на клеточную регенерацию и состояние апоптоза в эксперименте // Российский симпозиум по рефракционной хирургии, 1-й: Тезисы. – М., 1999. – С. 66.
43. Панасюк А.Ф., Ларионов Е.В. Хондроитинсульфаты и их роль в обмене хондроцитов и межклеточного матрикса хрящевой ткани // Научно-практическая ревматология. – 2000. – № 2. – С. 46-55.
44. Паштаев Н.П., Поздеева Н.А., Васильева А.Ю., Доментьева Л.Н., Овчинникова В.Н. Применение аутологичной сыворотки при заболеваниях глазной поверхности: Практическое руководство для врачей / АУ Чувашии «ИУВ». – Чебоксары, 2013. – 23 с.
45. Поздеева Н.А., Доментьева Л.Н., Васильева А.Ю., Овчинникова В.Н. Применение аутологичной сыворотки при заболеваниях глазной поверхности // Практическая медицина. – 2014. – № 1 (77). – С. 111-115.
46. Попов В.Ф., Попов О.В. Лекарственные формы интерферонов: Справочник врача. – М.: Триада-Х, 2002. – 229 с.

47. Пронкин И.А., Майчук Д.Ю. Рецидивирующая эрозия роговицы: этиология, патогенез, методы диагностики и лечения // Офтальмохирургия. – 2015. – № 1. – С. 62-67.
48. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др. ПЦР «в реальном времени». – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.
49. Сафонова Т.Н., Васильев В.И., Лихванцева В.Г. Синдром Шегрена. Руководство для врачей. – М.: Изд-во Московского ун-та. – 2013. – 600 с.
50. Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань. – М., 1981. – 321 с.
51. Слонимский А.Ю., Слонимский Ю.Б., Обрубков А.С. Новый нестероидный противовоспалительный препарат при лечении различной офтальмопатологии // Офтальмология. – 2016. – Т. 13, № 1. – С. 33-37.
52. Соловьев В.Д., Бектемиров Т.А. Интерферон в теории и практике медицины. – М.: Медицина, 1981. – 400 с.
53. Соловьев В.Д., Хесин Я.Е., Быковский А.Ф. Очерки из вирусной цитопатологии. – М.: Медицина, 1979. – 323 с.
54. Суров А.В. Герпес-вирусные увеиты у населения Омской области (эпидемиологические аспекты, диагностика и лечение): Автореф. ... дис. канд. мед. наук. – Омск, 2006.
55. Терещенко А.В., Белый Ю.А., Петерсен Е.В., Тахчиди Е.Х. и др. Изучение протекторного действия комплекса сульфатированных гликозаминогликанов на культуру клеток эпителия роговицы человека при токсическом воздействии раствора бензалкония хлорида в эксперименте *in vitro* // Катарактальная и рефракционная хирургия. – 2016. – № 1. – С. 51-56.
56. Терещенко А.В., Белый Ю.А., Тахчиди Е.Х., Новиков С.В. и др. Экспериментальное исследование влияния 0,1% раствора бензалкония хлорида на состояние роговицы // Вестн. Оренбургского гос. ун-та. – 2015. – № 12 (187). – С. 238-242.

57. Ченцова Е.В., Вериге Е.Н., Макаров П.В., Хазамова А.И. Кросслиндинг в комплексном лечении язв роговицы и трансплантата // Российский офтальмологический журнал. – 2017. – Т.10 №3. – С.93-100.
58. Чернакова Г.М., Аржиматова Г.Ш., Клещева Е.А., Семенова Т.Б. Герпес-вирусы в офтальмологии // Вестн. офтальмологии. – 2014. – Т. 130, № 4. – С. 127-131.
59. Щипанова А.И., Майчук Ю.Ф., Гапонюк П.Я. Офтальмоферон: экспериментальные исследования новой глазной лекарственной формы рекомбинантного интерферона // Человек и лекарство: Рос. нац. конгресс, 9-й. – М., 2002. – С. 728.
60. Щипанова А.И., Гулиева М.Г., Майчук Ю.Ф., Гапонюк П.Я. Медико-биологическая оценка новой глазной лекарственной формы рекомбинантного интерферона – глазных капель офтальмоферона // Актуальные проблемы офтальмологии: Юбил. симпозиум ГУ НИИ ГБ РАМН. – М., 2003. – С. 439.
61. Alfawaz A. Cytomegalovirus-related corneal endotheliitis: A review article // Saudi J. Ophthalmol. – 2013. – Vol. 27, No. 1. – P. 47-49.
62. Alio J.L., Abad M, Artola A, et al. Use of autologous platelet-rich plasma in the treatment of dormant corneal ulcers // Ophthalmology. – 2007. – Vol. 114. – P. 1286-1293.
63. Alio J.L., Colecha J.R., Pastor S. et al. Symptomatic dry eye treatment with autologous platelet-rich plasma // Ophthalmic Res. – 2007. – Vol. 39. – P.124-129.
64. Anitua E., de la Fuente M., Riestra A. et al. Preservation of biological activity of plasma and platelet-derived eye drops after their different time and temperature conditions of storage // Cornea. – 2015. – Vol. 34, No. 9. – P. 1144-1148.
65. Ameen R.S., Al-Shakarchi F.I., Abdulwahid B.A. Diagnosis of microbial keratitis causatives by polymerase chain reaction // J. Al-Nahrain University. – 2013. – Vol. 16, No. 3. – P. 183-190.

66. Arlt von F. Ueber die verletzungen des Auges in Gericht-sartzlicher beziehung // Wien Medizen. Wochenschr. – 1874. – No. 23. – P. 447-449.
67. Bauer D.J. Acyclovir treatment of experimental herpetic keratitis in the rabbit eye // Am. J. Med. – 1983. – Vol. 73. – P. 109-111.
68. Bean B. Acyclovir in the treatment of herpesvirus infections // Postgrad. Med. – 1983. – Vol. 73. – No. 3. – P. 297-303.
69. Biron K.K., Elion G.B. In vitro susceptibility of varicella-zoster virus to acyclovir // Antimicrob. Agents Chemother. – 1980. – Vol. 18. – P. 718-728.
70. Boudreau N., Simpson C., Werb Z. et al. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix // Science. – 1995. – Vol. 267. – P. 891-893.
71. Boudreau N., Werb Z., Bissell M. Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – Vol. 93. – P. 3500-3513.
72. Boxtel L., Lelij A., Meer J. et al. Cytomegalovirus as a cause of anterior uveitis in immunocompetent patients // Ophthalmology. – 2007. – Vol. 114. – P. 1358-1362.
73. Brijack N., Dekaris I., Gagro A. et al. Therapeutic effect of amniotic membrane in persistent epithelial defects and corneal ulcers in herpetic keratitis // Coll. Antropol. – 2008. – Vol. 32. – P. 21-25.
74. Brown N., Bron A. Recurrent erosion of the cornea // Br. J. Ophthalmol. – 1976. – Vol. 60. – P. 84-96.
75. Carlson N.E., Roach R.B. Platelet-rich plasma. Clinical application in dentistry // Dentistry&Medicine. – 2002. – Vol. 133. – P. 1383-1386.
76. Chen H., Pires T., Tseng S. Amniotic membrane transplantation for severe neurotrophic corneal ulcers // Br. J. Ophthalmol. – 2000. – Vol. 84. – P. 826-833.

77. Cogan D., Donaldson D., Kuwabara T. et al. Microcystic dystrophy of the corneal epithelium // *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* – 1964. – Vol. 62. – P. 213-225.
78. Colin J. Keratitie herpetique superficielle: traitement comparative en double insu par iododesoxycytidine et acyclovir // *Bull. Soc. Fr.* – 1984. – Vol. 84. – P. 1283-1286.
79. Colin J., Hoh H.B., Easty D.L. Ganciclovir ophthalmic gel (Virgan 0,15%) in the treatment of Herpes simplex keratitis // *Cornea.* – 1997. – Vol. 16. – P. 393-399.
80. Colin J., Tournoux A., Chastel C. Keratite herpetique superficielle. Traitement comparatif en double insu par acyclovir et idoxuridine // *Nouv. Presse Med.* – 1981. – Vol. 10. – P. 2969-2975.
81. Dawson C.R., Togni B. Herpes simplex eye infections: clinical manifestations, pathogenesis and management // *Surv. Ophthalmol.* – 1976. – Vol. 21, No. 2. – P. 121-135.
82. De Miranda P., Blum M.R. Pharmacokinetic of acyclovir after intravenous and oral administration // *J. Antimicrob. Chemother.* – 1983. – Vol. 12. – P. 29-37.
83. Dekaris I., Mravicić I., Barisić A. et al. Amniotic membrane transplantation in the treatment of persistent epithelial defect on the corneal graft // *Coll. Antropol.* – 2010. – Vol. 34. – P. 15-19.
84. Diez-Feijóo E., Grau A., Abusleme E. et al. Clinical Presentation and Causes of Recurrent Corneal Erosion Syndrome: Review of 100 Patients // *Cornea.* – 2014. – Vol. 33 – P. 571-575.
85. Dogru M., Tsubota K. Pharmacotherapy of dry eye // *Expert Opin. Pharmacother.* – 2011. – Vol. 12, No. 3. – P. 325-334.
86. Dohlman C., Bortichoff S., Mabilia E. Complications in use of soft contact lenses in corneal disease // *Arch. Ophthalmol.* – 1973. – Vol. 90. – P. 367-371.

87. Driver V.R. et al. A prospective, randomized, controlled trial of autologous platelet-rich plasma gel for the treatment of diabetic foot ulcers // *Ostomy Wound Manage.* – 2006. – Vol. 52, No. 6. – P. 68-74.
88. Dua H., Azuara-Blanco A. Amniotic membrane transplantation // *Br. J. Ophthalmol.* – 1999. – Vol. 83. – P. 748-752.
89. Duke-Elder W., Leigh A. *System of Ophthalmology: in 8 vol.* – St. Louis: CV Mosby Co, 1965. – Vol. 8. – P. 694-697.
90. Ernst M.E., Franey R.J. Acyclovir and ganciclovir-induced neurotoxicity // *Am. Pharmacother.* – 1998. – Vol. 32, No. 1. – P. 111-113.
91. Eschstruth P., Sekundo W. Different treatment options with excimer laser with emphasis on aggressive PTK // *Ophthalmology.* – 2006. – Vol. 103. – P. 570-575.
92. Fernandez-Barbero J. E., Galindo-Moreno P., Avila-Ortiz G. et al. Flow cytometric and morphological characterization of platelet-rich plasma gel // *Clin. Oral Implants Res.* – 2006. – Vol. 17, No. 6. – P. 687-693.
93. Fernandes M., Sridhar M., Sangwan V. et al. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction // *Cornea.* – 2005. – Vol. 24. – P.643-653.
94. Fox R.I., Chan R., Michelson J.B. et al. Beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis // *Arthritis Rheum.* – 1984. – Vol. 27, No. 4. – P. 459-461.
95. Fujikawa L., Foster C., Gipson I. et al. Basement membrane components in healing rabbit corneal epithelial wounds: immunofluorescence and ultrastructural studies // *J. Cell. Biol.* - 1984. – Vol. 98, No. 1. – P. 128-138.
96. Fukuda M., Deai T., Higaki S. et al. Presence of a large amount of herpes simplex virus genome in tear fluid of herpetic stromal keratitis and persistent epithelial defect patients // *Semin. Ophthalmol.* – 2008. – Vol. 23. – P. 217-220.

97. Galor A., Jeng B.H. Red eye for the internist: when to treat, when to refer // *Cleve Clin. J. Med.* – 2008. – Vol. 75. – P. 137-144.
98. Gelderen B.E., Lelij A., Treffers W.F. et al. Detection of herpes simplex virus type 1, 2 and varicella zoster virus DNA in recipient corneal buttons // *Br. J. Ophthalmol.* – 2000. – Vol. 84. – P. 1238-1243.
99. Goldman J., Dohlman C., Kravitt B. The basement membrane of the human cornea in recurrent epithelial erosion syndrome // *Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.* – 1969. – Vol. 73, No. 3. – P. 471-481.
100. Gumus K., Gire A., Pflugfelder S. The successful use of Boston ocular surface prosthesis in the treatment of persistent corneal epithelial defect after herpes zoster ophthalmicus // *Cornea.* – 2010. – Vol. 29. – P. 1465-1468.
101. Hansen E. Om den intermitterende keratitis visicularis neuralgica Af traumatisk opindelse // *Hospitals-Tidende.* – 1872. – No. 51. – P. 201-203.
102. Hao Y., Hui-Kang D., Hwang D. et al. Identification of antiangiogenic and anti-inflammatory proteins in human amniotic membrane // *Cornea.* – 2000. – Vol. 19. – P. 348-352.
103. Haung F.C., Tseng S.H., Shih M.H. et al. Effect of artificial tears on corneal surface regularity, contrast sensitivity and glare disability in dry eyes. // *Ophthalmology.* – 2002. – Vol. 109, No. 10. – P. 1934-1940.
104. Hosnuter M., Aslan C., Isik D. et. al. Functional assessment of autologous platelet-rich plasma (PRP) after long-term storage at -20°C without any preservation agent // *Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery.* – 2017. – Vol. 51, No. 4. – P. 235-239.
105. Hull D., Hvndiuk R., Chin G. et al. Clinical experience with the therapeutic hydrophilic contact lens // *Ann. Ophthalmol.* – 1975. – Vol. 7. – P. 555-562.
106. Inoue T., Kandori M., Takamatsu F. et al. Corneal endotheliitis with quantitative polymerase chain reaction positive for human herpesvirus 7 // *Arch. Ophthalmol.* – 2010. – Vol. 128, No. 4. – P. 502-503.

107. Jones L., MacDougall N., Sorbara L. Asymptomatic corneal staining associated with the use of balafilcon silicone-hydrogel contact lenses disinfected with a polyaminopropyl biguanide-preserved care regimen // *Optom. Vis. Sci.* – 2002. – Vol. 79. – P. 753-761.
108. Kaufman H. Clinical cure of herpes simplex keratitis by 5-iodo-2-desoxyuridine // *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*. – 1962. – Vol. 109. – P. 251-252.
109. Kaufman H. Herpetic keratitis // *Invest. Ophthalmol.* – 1978. – Vol. 17. – P. 941-957.
110. Kaufman H., Haw W.H. Ganciclovir ophthalmic gel 0.15%: safety and efficacy of a new treatment for herpes simplex keratitis // *Curr. Eye Res.* – 2012. – Vol. 37, No. 7. – P. 654-660.
111. Kaufman H., Heidelberger C. Therapeutic antiviral action of 5-trifluoromethyl-2-deoxyuridine in herpes simplex keratitis // *Science*. – 1964. – Vol. 145. – P. 585-586.
112. Kaye S.B., Baker K., Bonshek R. Human herpesviruses in the cornea // *Br. J. Ophthalmol.* – 2000. – Vol. 84. – P. 563-571.
113. Khater M.M., Selima A.A., El-Shorbagy M.S. Role of argon laser as an adjunctive therapy for treatment of resistant infected corneal ulcers // *Clin. Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 8. – P. 1025-1030. doi: 10.2147/OPTH.S59928
114. Khodadoust A., Silverstein A., Kenyon K. et al. Adhesion of regenerating corneal epithelium: the role of basement membrane // *Am. J. Ophthalmol.* – 1968. – Vol. 57. – P. 311-317.
115. Khodadoust A.A., Attarzadeh A. Presumed autoimmune corneal endotheliopathy // *Am. J. Ophthalmol.* – 1982. – Vol. 93. – P. 718-722.
116. Kim K.M., Shin Y.T., Kim K.H. Effect of autologous platelet-rich plasma on persistent corneal epithelial defect after infectious keratitis // *Jpn. J. Ophthalmol.* – 2012. – Vol. 56, No. 6. – P. 544-550.

117. Kim S.I., Flach A.J., Jampol L.M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in ophthalmology // *Surv. Ophthalmol.* – 2010. – Vol. 55, No. 2. – P. 108-133.
118. Knox R.L., Hunt A.R., Collins J.S. et al. Platelet-Rich Plasma combined with skin substitute for chronic wound healing: a case report // *J. Am. Society of Extra-Corporeal Technology.* – 2006. – Vol. 38. – P. 260-264.
119. Koizumi N., Yamasaki K., Kawasaki S. Cytomegalovirus in aqueous humor from an eye with corneal endotheliitis // *Am. J. Ophthalmol.* – 2006. – Vol. 141. – P. 564-565.
120. Kordić R., Suić S., Jandroković S. et al. Application of the amniotic membrane extract (AMX) for the persistent epithelial defect (PED) of the cornea // *Coll. Antropol.* – 2013. – Vol. 37. – P. 161-164.
121. Kruse F., Rohrschneider K., Volcker H. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers // *Ophthalmology.* – 1999. – Vol. 106. – P. 1504-1511.
122. Lambiase A., Sullivan B.D., Schmidt T.A. A Two-Week, randomized, double-masked study to evaluate safety and efficacy of lubricin (150 µg/mL) eye drops versus sodium hyaluronate (HA) 0.18% eye drops (Vismed®) in patients with moderate dry eye disease // *Ocular Surf.* – 2016. – Vol. 15, No. 1. – P. 77-87.
123. Langston R., Machamer C., Norman C. Soft lens therapy for recurrent erosion syndrome // *Ann. Ophthalmol.* – 1978. – Vol. 10. – P. 875-878.
124. Leeming J.P. Treatment of ocular infections with topical antibacterials // *Clin. Pharmacokinet.* – 1999. – Vol. 37. – P. 351-360.
125. Ling J., Gire A., Pflugfelder S. PROSE therapy used to minimize corneal trauma in patients with corneal epithelial defects // *Am. J. Ophthalmol.* – 2013. – Vol. 155. – P. 615-619.
126. Liu J., Sheha H., Fu Y. Update on amniotic membrane transplantation // *Expert Rev. Ophthalmol.* – 2010. – Vol. 5. – P. 645-661.

127. Looker K.J., Garnett G.P., Schmid G.P. An estimate of the global prevalence and incidence of herpes simplex virus 2 infection // *Bull. World Health Organ.* – 2008. – Vol. 86, No. 10. – P. 805-812.
128. Man D., Plosker H., Winland-Brown J.E. Use autologous platelet-rich plasma and autologous platelet-poor plasma in cosmetic surgery // *Plastic&Reconstructive Surgery.* – 2001. – Vol. 107, No. 1. – P. 239-249.
129. Markomichelakis N.N., Canakis C., Zafirakis P. Cytomegalovirus as a cause of anterior uveitis with sectoral iris atrophy // *Ophthalmology.* – 2002. – Vol. 109. – P. 879-882.
130. Meier S., Hey E. Stimulation of extracellular matrix synthesis in developing cornea by glycosaminoglycans // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1974. – Vol. 71. – No. 6. – P. 2310-2313.
131. Morris D. J, Cleator G. M., Klapper P. E. et al. Detection of herpes simplex virus DNA in donor cornea culture medium by polymerase chain reaction // *Br. J. Ophthalmol.* – 1996. – Vol. 80. – P. 654-657.
132. Oskouee S., Amuzadeh J., Rajabi M. Bandage contact lens and topical indomethacin for treating persistent corneal epithelial defects after vitreoretinal surgery // *Cornea.* – 2007. – Vol. 26. – P. 1178-1181.
133. Park W., Tseng S. Temperature cooling reduces keratocyte death in excimer laser ablated corneal and skin wounds // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1998. – Vol. 39. – P. 449.
134. Pfister R. The normal surface of corneal epithelium: a scanning electron microscopic study // *Invest. Ophthalmol. (Copenh).* – 1973. – Vol. 12, No. 9. – P. 654-668.
135. Prabhasawat P., Kosrirukvong P., Booranapong W. et al. Application of preserved human amniotic membrane for corneal surface reconstruction // *Cell Tis. Bank.* – 2000. – Vol. 1. – P. 213-222.

136. Radi Z.A., Render J.A. The pathophysiologic role of cyclooxygenases in the eye // *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* – 2008. – Vol. 24, No. 2. – P. 141-151.
137. Robert P.Y., Traccard I., Adenis J.P. et al. Multiplex detection of herpesviruses in tear fluid using the "stair primers" PCR method: prospective study of 93 patients // *J. Med. Virol.* – 2002. – Vol. 66, No. 4. – P. 506-511.
138. Robert P.Y., Adenis J.P., Denis F. et al. Herpes simplex virus DNA in corneal transplants: prospective study of 38 recipients // *J. Med. Virol.* – 2003. – Vol. 71, No. 1. – P. 69-74.
139. Rosenthal A.R., Harbury C., Egbert P. et al. Use of a plateletfibrinogen-thrombin mixture as a corneal adhesive: experiments with sutureless lamellar keratoplasty in the rabbit // *Invest. Ophthalmol.* – 1975. – Vol. 14. – P. 872-875.
140. Rubinfeld R.S., Laibson P.R., Cohen E.J. et al. Anterior stromal puncture for recurrent erosion: further experience and new instrumentation // *Ophthalmic Surg.* – 1990. – Vol. 21. – P. 318-326.
141. Saad Shaikh, Christopher T.A. Evaluation and management of Herpes Zoster Ophthalmicus // *Am. Fam. Physician.* – 2002. – Vol. 66, No. 9. – P. 1723-1730.
142. Sahin A., Hamrah P. Acute Herpetic Keratitis: What is the role for ganciclovir ophthalmic gel? // *Ophthalmol. Eye Dis.* – 2012. – Vol. 4. – P. 23-34.
143. Saika S., Shiraishi A., Liu C.Y. et al. Role of lumican in the corneal epithelium during wound healing // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 2607-2612.
144. Sampson S. et al., Platelet-rich plasma injection graft for musculoskeletal injuries: a review // *Cur. Rev. Musculoskelet Med.* – 2008. – Vol. 1. – P. 165-174.
145. Santodomingo-Rubido J., Wolffsohn J., Gilmartin B. Changes in ocular physiology, tear film characteristics, and symptomatology with 18 months silicone hydrogel contact lens wear // *Optom. Vis. Sci.* – 2006. – Vol. 83. – P. 73-81.

146. Schechter B.A., Trattler W. Efficacy and safety of bromfenac for the treatment of corneal ulcer pain // *Adv. Ther.* – 2010. – Vol. 27, No. 10. – P. 756-761.
147. Shimazaki J., Shinozaki I., Tsubota K. Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon // *Br. J. Ophthalmol.* – 1998. – Vol. 82. – P. 235-240.
148. Shimomura Y., Deai T., Fukuda M. et al. Corneal buttons obtained from patients with HSK harbor high copy numbers of the HSV genome // *Cornea.* – 2007. – Vol. 26. – P. 190-193.
149. Shimomura Y., Higaki S. The kinetics of herpes virus on the ocular surface and suppression of its reactivation // *Cornea.* – 2011. – Vol. 30, No. 1. – P. 3-7.
150. Su C., Lin C. Combined use of an amniotic membrane and tissue adhesive in treating corneal perforation: a case report // *Ophthalmic Surg. Lasers.* – 2000. – Vol. 31. – P. 151-154.
151. Sundmacher R., Bergmann F. Herpetic eye disease. – München: Verlag, 1981. – P. 175-178.
152. Suzuki T., Hara Y., Uno T., Ohashi Y. DNA of cytomegalovirus detected by PCR in aqueous of patient with corneal endotheliitis after penetrating keratoplasty // *Cornea.* – 2007. – Vol. 26. – P. 370-372.
153. Szili A. Ueber disjunction des Hornhaut epithels // *Albrecht Von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* – 1900. – № 51. – P. 486-531.
154. Tabery H. Herpes simplex virus epithelial keratitis. – Berlin: Springer-Verlag, 2010. – P. 58.
155. Tabbara K.F., Ostler H.B., Dawson C. et al. Thygeson's superficial punctate keratitis // *Ophthalmology.* – 1981. – Vol. 88. – P. 75-77.

156. Tanidir S.T. et al. The Effect of Subconjunctival Platelet-Rich Plasma on Corneal Epithelial Wound Healing // *Cornea*. – 2010. – Vol. 29, No. 6. – P. 664-669.
157. Thoft R., Mobilia E. Complications with therapeutic extended wear soft contact lenses // *Int. Ophthalmol. Clin.* – 1981. – Vol. 21. – P. 197-208.
158. Tripathi R., Bron A. Ultrastructural study of non-traumatic recurrent corneal erosion // *Br. J. Ophthalmol.* – 1972. – Vol. 56. – P. 73-85.
159. Tsubota K., Goto E., Fujita H. et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome // *Br. J. Ophthalmol.* – 1999. – Vol. 83, No. 4. – P. 390-395.
160. Tsubota K., Goto E., Shimmura S. et al. Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application // *Ophthalmology*. – 1999. – Vol. 106. – P. 1984-1989.
161. Van Gelderen B.E., Van der Lelij A., Treffers W.F. et al. Detection of herpes simplex virus type 1, 2 and varicella zoster virus DNA in recipient corneal buttons // *Br. J. Ophthalmol.* – 2000. – Vol. 84, No. 11. – P. 1238-43.
162. Varki A., Cummings R.D., Esko J.D. et al. *Essentials of Glycobiology*, 2nd edition. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. – 420 p.
163. Wang J., Zhao G., Xie L. et al. Therapeutic effect of deep anterior lamellar keratoplasty for active or quiescent herpetic stromal keratitis // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2012. – Vol. 250, No. 8. – P. 1187-1194.
164. Wagner R.S., Abelson M.B., Shapiro A. et al. Evaluation of moxifloxacin, ciprofloxacin, gatifloxacin, ofloxacin, and levofloxacin concentrations in human conjunctival tissue // *Arch. Ophthalmol.* – 2005. – Vol. 123. – P. 1282-1283.
165. Walpita P., Darougar S., Thaker U. A rapid and sensitive culture test for detecting herpes simplex virus from the eye // *Br. J. Ophthalmol.* – 1985. – Vol. 69. – P. 637-639.

166. Whitcher J.P., Srinivasan M., Upadhyay M.P. et al. Corneal blindness: a global perspective // Bull. World Health Organ. – 2001. – Vol. 79, No. 3. – P. 214-221.
167. Wood T. Recurrent erosion // Trans. Am. Ophthalmol. Soc. – 1984. – Vol. LXXXII. – P. 850-898.
168. Yokogawa H., Kobayashi A., Yamazaki N. et al. Identification of cytomegalovirus and human herpesvirus-6 DNA in a patient with corneal endotheliitis // Jpn. J. Ophthalmol. – 2013. – Vol. 57, No. 2. – P. 185-190.