

*На правах рукописи*

**Аверич Вероника Валерьевна**

**КЛИНИКО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ  
КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ СИНДРОМА СУХОГО ГЛАЗА ПРИ  
ГЛАУКОМЕ**

14.01.07 – глазные болезни

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2019

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно–исследовательский институт глазных болезней»

**Научный руководитель:**  
доктор медицинских наук

**Егорова Галина Борисовна**

**Официальные оппоненты:**

**Майчук Дмитрий Юрьевич**, доктор медицинских наук, ФГАУ «Научный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н.Федорова» Министерства здравоохранения РФ, заведующий отделом терапевтической офтальмологии

**Ловпаче Джамия Нурийдиновна**, кандидат медицинских наук, ООО «Три-3-МСК», врач-офтальмолог, эксперт по глаукоме

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И.Пирогова» Министерства здравоохранения РФ

Защита состоится « 18 » марта 2019 г. в 14-00 на заседании диссертационного совета Д 001.040.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно–исследовательский институт глазных болезней» по адресу: 119021, Москва, ул. Россолимо, д. 11 А,Б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте [www.niigb.ru](http://www.niigb.ru) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно–исследовательский институт глазных болезней»

Автореферат диссертации разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук

**Иванов М.Н.**

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность темы и степень ее разработанности**

Синдром «сухого глаза» в настоящее время является очевидной проблемой для каждого практикующего врача-офтальмолога. Нарушение механизма функционирования прекорнеальной слезной пленки зависит от многих факторов воздействия, как внутренних, так и внешних. К внешним факторам относятся хирургические вмешательства (LASIK, ФЭК, антиглаукомные операции и др.), имеет место также длительное воздействие инстилляций медикаментозных препаратов при хронических состояниях, таких как глаукома, что может вызвать появление признаков вторичного синдрома «сухого глаза» [Еременко А.И., Янченко С.В., 2006, Майчук Ю.Ф., Яни Е.В., 2009]. В зарубежной литературе наиболее часто употребляется термин «ятрогенный сухой глаз», что также обозначает вторичный ССГ или искусственный, возникающий в ответ на внешнее воздействие [Holly F.G., 2003.,Singh G , Kaur J., 1992].

Необходимо учитывать, что подавляющее большинство офтальмогипотензивных капель, в целях профилактики бактериальной контаминации и предотвращения распада активного вещества, содержат в своем составе консерванты. Самым распространенным из них является бензалконий хлорид (БХ), относящийся к одним из наиболее токсичных консервантов, входящих в состав глазных капель [Badouin C., 2008; Debbash C.,2001]. Воздействие бензалкония хлорида на клетки передней поверхности глаза было доказано рядом экспериментальных исследований *in vitro*, на культуре конъюнктивальных клеток [Badouin C., 2008; De Saint Jean M., 2000; Debbash C.,2001; Robert Noecker, 2011]. Производились также исследования и офтальмогипотензивных препаратов содержащих в своем составе бензалконий хлорид, наиболее активно используемых в клинической практике для компенсации ВГД при глаукоме. Результаты проведенных исследований демонстрируют, что токсическое действие данного вещества зависит от дозы и длительности его воздействия [Arici M. 2000 et all, 2000;

David A. Ammar et al, 2011; Erb C. et al, 2011; Epstein S. et al, 2009; Thierry Pauloin et al, 2008; Aguayo Bonniard et al, 2016].

На фоне лечения и компенсации внутриглазного давления, практикующий врач-офтальмолог крайне редко принимает во внимание сформировавшиеся или уже имеющиеся признаки синдрома «сухого глаза», которые могут прогрессировать. Лечение таких пациентов представляет значимую проблему и требует разработки схемы медикаментозной терапии. Наиболее широкое применение в лечении легких и средних стадий синдрома «сухого глаза» получили препараты «искусственной слезы», содержащие в своем составе гиалуронат натрия.

В настоящее время созданы комбинированные препараты, содержащие компоненты для дополнительной стимуляции регенераторных процессов. Слезозаменитель «Стиллавит» является трехкомпонентным препаратом (гиалуронат натрия, декспантенол, хондроитин сульфат), при использовании которого в сочетании с гипотензивными антиглаукомными средствами можно ожидать проявления достаточного протекторного эффекта, снижающего неблагоприятное действие консерванта. В связи с этим, представляет интерес изучение возможностей снижения цитотоксического эффекта бензалкония хлорида с помощью данного слезозаменителя в условиях эксперимента (*in vitro*) для обоснования его использования в клинической практике.

#### **Цель исследования:**

Изучить влияние антиглаукомных средств гипотензивной терапии, содержащих консервант бензалкония хлорид, на морфофункциональное состояние глазной поверхности. Оценить возможности его снижения с помощью слезозаменителя «Стиллавит» и средств репаративной регенерации.

#### **Задачи исследования:**

1. Определить комплекс методик для объективной оценки состояния глазной поверхности и экспериментального обоснования использования

протектора для снижения токсического действия консерванта, как составляющей антиглаукомных препаратов.

2. Оценить цитотоксичность антиглаукомного гипотензивного препарата, содержащего в составе БХ, и возможность протекторного эффекта слезозаменителя «Стиллавит» на культуре клеток лимба роговицы (в условиях эксперимента *in vitro*) с помощью МТС-теста.

3. С помощью конфокальной микроскопии изучить морфологические особенности роговицы при некомпенсированном ВГД и компенсации ВГД в условиях длительного использования гипотензивной терапии.

4. Оценить эффективность и целесообразность местного применения слезозаменительной терапии и стимуляторов репаративной регенерации у больных глаукомой для снижения токсического действия БХ и коррекции синдрома «сухого глаза» на фоне длительного использования офтальмогипотензивных препаратов.

5. Разработать схему медикаментозной коррекции синдрома сухого глаза совместно с использованием средств гипотензивной терапии при глаукоме.

#### **Научная новизна:**

1. Проведено детальное комплексное систематизированное исследование с оценкой исходного состояния роговицы, эпителия конъюнктивы, состояния слезопродукции и прекорнеальной слезной пленки у больных глаукомой на фоне длительного гипотензивного медикаментозного режима.

2. Впервые получены доказательства протекторного эффекта слезозаменителя («Стиллавит») в снижении токсического воздействия БХ в условиях эксперимента (*in vitro*) на культуре клеток лимба роговицы.

Возможность медикаментозной коррекции патологических изменений глазной поверхности с помощью слезозаменительной терапии при глаукоме при длительном использовании антиглаукомных препаратов подтверждены результатами клинической части проведенных исследований.

3. Впервые, с помощью конфокальной микроскопии, оценены морфологические нарушения в слоях роговицы у пациентов с глаукомой без медикаментозного режима на фоне повышенного ВГД и при компенсации ВГД в условиях длительного применения гипотензивных препаратов, содержащих БХ.

4. Впервые доказано, что величина интенсивности светорассеяния может быть использована в качестве дополнительного критерия для оценки морфологических изменений роговицы при воздействии различных неблагоприятных, повреждающих факторов, а также оценки эффективности использования медикаментозных средств.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы.**

Разработан алгоритм исследований и определены критерии для назначения слезозаменительной терапии с целью медикаментозной коррекции изменений глазной поверхности при длительном применении антиглаукомных препаратов (особенно содержащих консерванты) и улучшения их переносимости.

#### **Методология и методы диссертационного исследования.**

Методологической основой диссертационной работы явилось последовательное применение методов научного познания. Работа выполнена в дизайне проспективного открытого исследования с использованием клинических, инструментальных и статистических методов.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. В условиях эксперимента (in vitro) продемонстрировано токсическое повреждающее действие БХ на культуру клеток лимба роговицы и доказан положительный цитопротекторный эффект слезозаменителя («Стиллавит»).

2. Длительное использование антиглаукомных препаратов, содержащих БХ, приводит к изменениям глазной поверхности в виде нарушения структуры

эпителиального слоя роговицы и эпителиальной выстилки конъюнктивы век и глазного яблока. Данные изменения в сочетании со снижением стабильности слезной пленки и снижением слезопродукции могут быть причиной ухудшения переносимости антиглаукомных средств.

3. Следствием повышения ВГД, а также длительного использования гипотензивных препаратов при глаукоме являются характерные морфологические изменения в слоях роговицы.

Данные изменения приводят к колебаниям показателей преломления компонентов роговичной ткани и изменению интенсивности светорассеяния.

4. Слезозаменительная терапия и использование стимуляторов репаративной регенерации при длительном использовании антиглаукомных препаратов, содержащих БХ, способствуют коррекции симптомов ССГ, восстановлению структуры глазной поверхности и снижению степени морфологических нарушений в слоях роговицы.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных результатов определяет репрезентативный объем материала, применение современных методов исследований и объективных методов обработки данных. В работе использовано современное сертифицированное офтальмологическое оборудование, условия исследования стандартизованы для выполнения поставленных задач. Анализ материала и статистическая обработка полученных данных выполнены с применением современных методов сбора и обработки научных данных.

Результаты исследования доложены на: XV Всероссийская юбилейная научно-практическая конференция "Федоровские чтения» - 2017г., XVI Всероссийская школа офтальмолога – 2017г., XV Всероссийская школа офтальмолога – 2017г, XXIII Международный офтальмологический конгресс "Белые ночи" – 2017г.

**Личный вклад автора в проведенное исследование** состоит в непосредственном участии в проведении клинических исследований, обработке, интерпретации и анализе результатов, подготовке публикации.

**Внедрение результатов работы.** Результаты работы внедрены в клиническую практику ФГБНУ «НИИГБ».

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 4 - в журнале, входящем в перечень, рекомендуемый ВАК.

**Структура и объем диссертационной работы** Диссертация изложена на 127 страницах машинописного текста, иллюстрирована 5 таблицами, 36 рисунками и фотографиями. Работа состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований, выводов, заключения, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 185 источников, из них 65 - отечественных и 120 - зарубежных.

#### **Практическая значимость.**

Результаты исследований позволят оценить эффективность и целесообразность местного применения слезозаместительной терапии при глаукоме с целью купирования симптомов ССГ и его профилактики.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Материал и методы исследования.** Работа была подразделена на две части: экспериментальная и клиническая. Обследование проводили на базе ФГБНУ «НИИГБ».

**На первом этапе (экспериментальная часть исследования),** для обоснования целесообразности применения слезозаместительной терапии при глаукоме была проведена *оценка цитотоксичности антиглаукомного гипотензивного препарата, содержащего в составе БХ, и протекторного действия слезозаместителя «Стиллавит» на культуре клеток лимба роговицы.*



Тестируемые образцы:

1. *Хлорид бензалкония*: концентрация 0,02%(данная концентрация является максимальной в антиглаукомных препаратах).
2. *Антиглаукомный гипотензивный препарат «Пролатан»* (Сентисс Фарма, Индия, регистрационный № ЛП-002748 от 10.12.2014). Действующее вещество – латанопрост 0,005%, в качестве консерванта содержит БХ 0,02% («латанопрост/БХ»);
3. *Слезозаменительный препарат «Стиллавит»* (ООО «Компания Офтальм-Ренессанс», регистрационный № ФСР 2009/05440 от 14.08.2009), действующие вещества: гиалуронат натрия 0,16%, хондроитина сульфат натрия 0,05%, D-пантенол 1%, консервант - тетраборат натрия 0,05%.

Была использована первичная культура клеток лимба роговицы. Клетки были получены методом проращивания из экспланта, культивировались на ростовой среде DMEM/F12 (Gibco) с добавлением антибиотиков (пенициллин 100 Ед/мл, стрептомицин 100 мкг/мл, «Gibco»), GlutaMax (2 мМ, «Gibco») и 15% фетальной сыворотки теленка («Biowest»). Исследование проводили на клетках 3-го пассажа (пассаж - 1 неделя) в стандартных условиях при  $t +37^{\circ}\text{C}$  во влажной атмосфере с 5%  $\text{CO}_2$ . Клетки высаживались в лунки 96-луночного культурального планшета (по 3 тыс. клеток на лунку в 100 мкл ростовой среды). После 24 часов культивирования вносили исследуемый препарат. Экспозицию с препаратом проводили на протяжении короткого времени – 30 минут, повторяя динамику максимального контакта в слёзной жидкости. После времени экспозиции среду заменяли и проводили оценку эффекта.

Первоначально был оценен эффект воздействия на клеточную культуру препаратов в 100% концентрации:

1. Латанопрост + БХ;
2. Латанопрост + БХ с одновременным добавлением в культуру Стиллавита.

Второй фрагмент исследования заключался в проведении анализа влияния последовательных разведений вышеуказанных препаратов. Для разведения использовалась питательная среда.

Задачей следующего этапа была оценка уровня жизнеспособности клеток после экспозиции их с разведенными веществами в различной комбинации:

1. Латанопрост + БХ (воздействие в течение 30 минут);
2. Последовательное добавление в культуру Стиллавита и затем через 30 минут добавление препарата (латанопрост + БХ);
3. Одновременное добавление в культуру Стиллавита и препарата (латанопрост + БХ).

Для оценки жизнеспособности клеток в культуре был использован МТС - реагент (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолиум) с применением набора CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent («Promega»). МТС-тест является колориметрическим методом, позволяющий определить число жизнеспособных клеток по их митохондриальной активности.

**На втором этапе (клиническая часть исследования)** было включено и обследовано 122 пациента (244 глаз).

Гендерно-возрастной состав группы: 53 мужчины (106 глаз) и 69 женщин (138 глаз), средний возраст пациентов составил  $66 \pm 11$  (от 55 до 80) лет.

Задачей первого фрагмента была оценка морфологических особенностей роговицы у пациентов с помощью метода конфокальной микроскопии:

1. С некомпенсированным ВГД, без медикаментозного режима, с первично установленным диагнозом глаукомы (20 пациента, 40 глаз)
2. С компенсированным ВГД (22 пациента, 44 глаза), длительно использующих антиглаукомные препараты, содержащие БХ (от 2 месяцев до 17 лет). Исследование проводили с помощью конфокального микроскопа «Confoscan - 4» фирмы Nidek (Япония).

На данном приборе, на основе анализа денситометрической кривой в системе Z-сканирования проводилось *исследование уровня интенсивности светорассеяния* во всех слоях роговицы. Были обследованы пациенты:

1. Группы контроля, 20 человек (40 глаз) для определения уровня светорассеяния в норме
2. С некомпенсированным ВГД (22 пациента, 44 глаза)
3. С медикаментозно компенсированным ВГД (24 пациента, 46 глаза).

**Задачей второго фрагмента** была оценка состояния глазной поверхности и уровня слезопродукции у 58 пациентов (116 глаз) на фоне применения антиглаукомных гипотензивных препаратов (от 2 месяцев до 17 лет), содержащих БХ. Обследование проводили на фоне компенсированного ВГД. Всем пациентам в дополнение к гипотензивному медикаментозному режиму с целью медикаментозной коррекции ССГ был назначен слезозаменитель «Стиллавит». Применять инстилляцию данного слезозаменителя было рекомендовано за 10–15 минут до закапывания гипотензивных средств. По показаниям дополнительно назначались стимуляторы репаративной регенерации (Корнерегель, Valeant; Солкосерил, Valeant; Вита-Пос, Ursapharm). Режим подбирали индивидуально.

Все пациенты были обследованы до назначения слезозаместительной терапии и через 1, 3 и 6 месяцев. Обследование пациентов включало стандартные офтальмологические процедуры: сбор анамнеза, авторефрактометрия, визометрия, биомикроскопия.

С помощью дополнительных методов оценивали: суммарную слезопродукцию (*тест Ширмера*, Schirmer O., 1903). Для оценки базальной слезопродукции проводили *пробу Джонеса* (Jones L.T., 1966) с предварительной инстилляцией, за 5-7 минут до исследования, анестетика 0,4% оксибупрокаина («Инокаин», Сентис Фарма, Индия, регистрационный № П N012272/01 от 04.04.2008). *Проба Норна (ВРСП)* проводили по общепринятой методике, путем окрашивания глазной поверхности

флюоресцеином с помощью тест-полосок FluoStrips (Contacare Ophthalmics and Diagnostics, Индия, регистрационный № ФСЗ 2012/11856 от 04.04.2012). Степень эпителиопатии роговицы оценивали по Оксфордской системе Брона (Bron A., 2003) с помощью тест-полосок с флюоресцеином FluoStrips. Для оценки высоты и ширины нижнего слезного мениска использовали *метод ОКТ-менискометрии*, который проводили на оптическом когерентном томографе (Visant OCT, Zeiss). Для визуализации липидного слоя прекорнеальной слезной пленки и оценки его толщины был использован *усовершенствованный метод тиаскопии*, разработанный в ФГБНУ «НИИГБ», основанный на фоторегистрации цветового феномена интерференции. Для получения более подробной информации регистрируемых изображений была использована компьютерная программа «Lacrīma», позволяющая на основе анализа цифрового изображения интерференционной картины получать данные о толщине липидного слоя, оценивать площадь исследуемой зоны (в %), с определенной его толщиной, а также судить о равномерности распределения липидов.

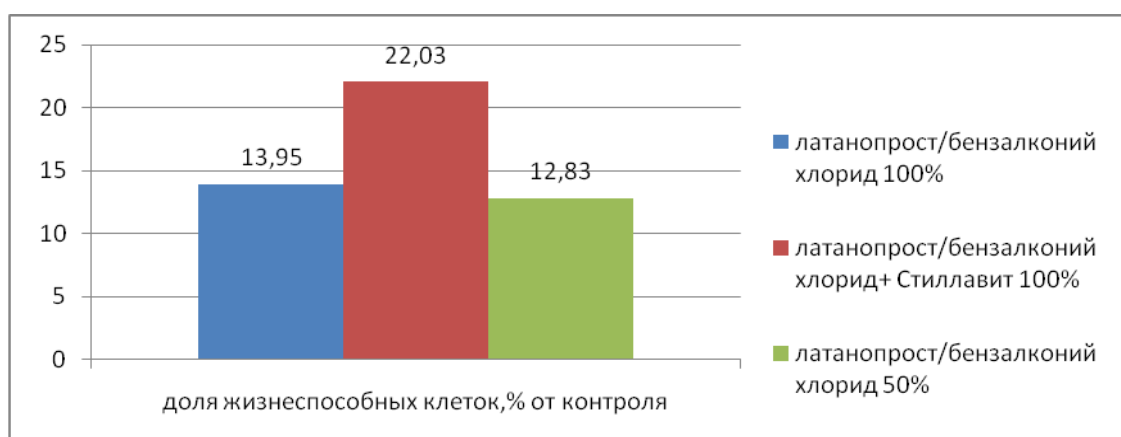
## **РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

**Экспериментальная часть исследования.** С целью обоснования использования средств слезозаместительной терапии (в частности препарата «Стиллавит») для снижения токсического действия БХ в составе антиглаукомных препаратов была проведена *оценка влияния препаратов на первичной культуре клеток лимба роговицы*.

*Первый фрагмент* исследования проведен для оценки эффекта воздействия на клеточную культуру препаратов в 100% и 50% концентрации: латанопрост + БХ; и с одновременным добавлением в культуру Стиллавита. Уровень жизнеспособности клеток при внесении препарата (латанопрост + БХ) в 100% концентрации составляет 13,95% от контрольных значений (100%). При разведении этого же препарата в 2 раза (50% концентрация), уровень жизнеспособности клеток составил 12,83%. Снижение цитотоксического действия данного препарата в 50% концентрации, по

сравнению с воздействием в 100% концентрации было незначительным (без статистически значимых различий ( $P > 0,05$ ), что позволило считать корректными полученные данные при совместном внесении антиглаукомного препарата и слезозаменителя (рис.1).

При внесении исследуемого антиглаукомного препарата совместно со Стиллавитом уровень жизнеспособности достоверно возрастает (на 8,08%) и достигает 22,03%, что свидетельствует о снижении токсического действия на культуру клеток лимба роговицы.

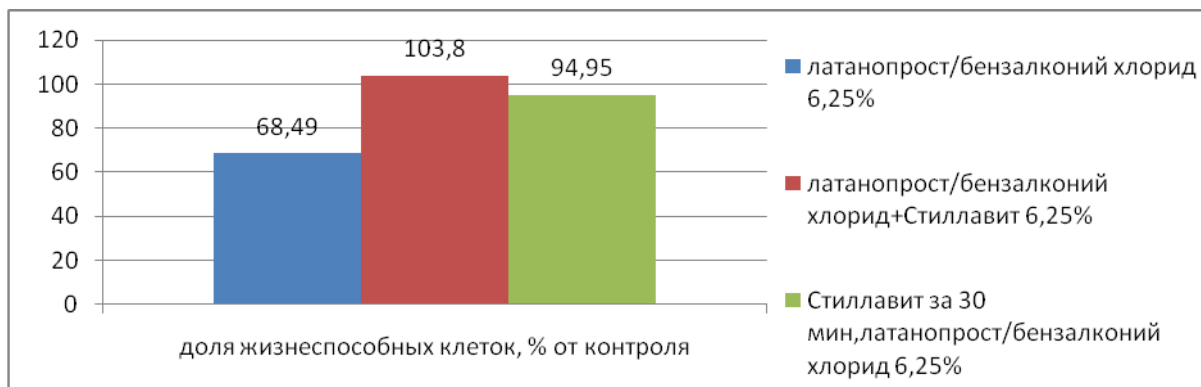


**Рис.1. Уровень жизнеспособности клеток лимба роговицы после экспозиции с латанопростом/БХ, с латанопростом/БХ+Стиллавитом в 100% концентрации и латанопростом/БХ в 50% концентрации.**

По результатам серии экспериментов второго фрагмента исследования было установлено, что выживаемость клеток на уровне 60-80% и их детектируемую метаболическую активность наблюдали при разведении препарата (латанопрост/БХ) в образце в 32 раза, что в пересчете на содержание бензалкония хлорида составляет 0,0125 мг/мл, а в отношении препарата к объему - 6,25%.

На следующем этапе оценивали уровень жизнеспособности клеток при внесении к ним препаратов в разведении 6,25%. Уровень выживаемости клеток при воздействии препарата (латанопрост + БХ) в концентрации 6,25% составил 68,49%. Цитотоксическое действие препарата вызвало снижение количества жизнеспособных клеток на 31,5% по сравнению с контролем.

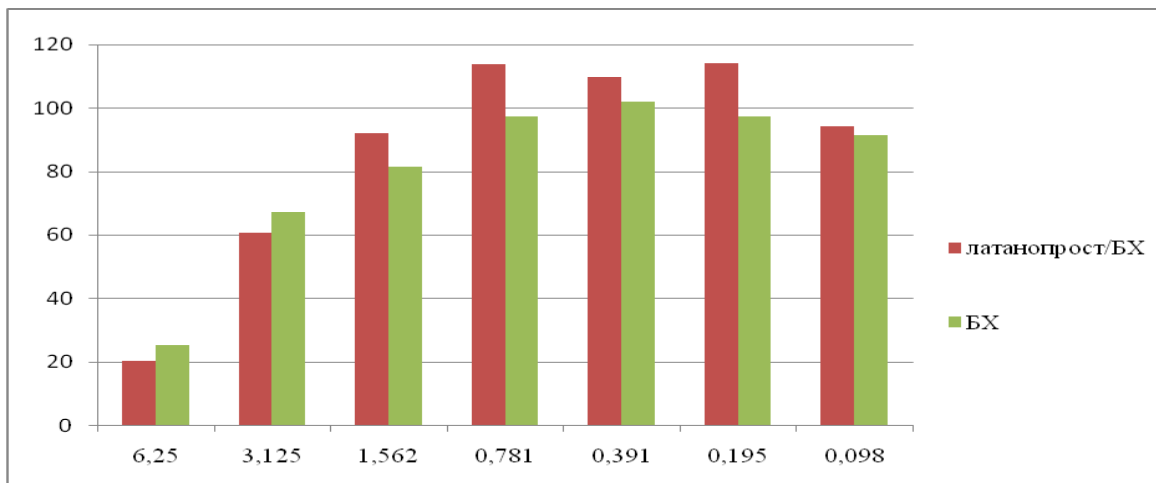
Было установлено, что как предварительное (за 30 минут до внесения препарата латанопрост + БХ), так и одновременное добавление Стиллавита увеличивает показатели выживаемости клеточной культуры – до  $94,95 \pm 12,52$  и  $103,8 \pm 12,45\%$  соответственно (рис. 2). Наблюдаемые различия статистически значимы при уровне надежности 95%.



**Рис. 2** Уровень жизнеспособности клеток лимба роговицы после экспозиции в разных схемах при разведении 6,25%: латанопрост/БХ; и латанопрост/БХ + Стиллавит; Стиллавит за 30 минут до внесения латанопрост/БХ

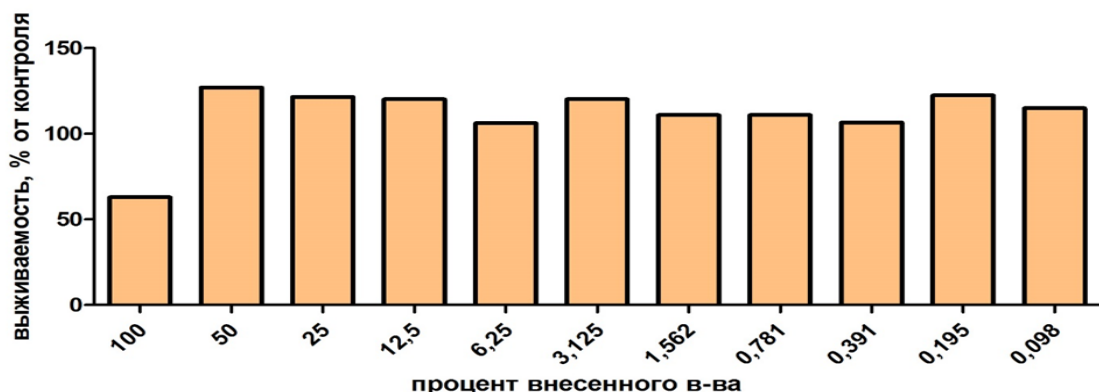
На завершающем этапе был проведен анализ влияния последовательных разведений препаратов латанопрост+БХ и чистого Хлорида бензалкония на показатели цитотоксичности на культуре клеток

Как видно из диаграммы (Рис.3) значения выживаемости в группе с добавлением препарата (латанопрост+БХ) и группе с добавлением хлорида бензалкония очень близки, статистически значимая разница между значениями отсутствует ( $P > 0,05$ ) коэффициент корреляции между этими совокупностями составил 0,98, что свидетельствует о том, что в условиях кратковременного воздействия на культуру клеток токсический эффект препарата обусловлен наличием в его составе хлорида бензалкония.



**Рис.3** Уровень жизнеспособности клеток лимба роговицы (%) при внесении к ним последовательных разведений препаратов Латанопрост+ Бензалконий хлорид и Хлорида бензалкония.

Для оценки токсического влияния консерванта в составе слезозаменителя «Стиллавит» в сравнении с воздействием БХ на клетки глазной поверхности, нами было предпринято проведение серии экспериментов со слезозаменителем «Стиллавит» в 100% концентрации и в последующих его разведениях. Установлено, что значимое по отношению к контролю снижение выживаемости до 60%, наблюдалось только в максимальной концентрации (100%), в остальных разведениях показатели были сопоставимы с контрольными и даже превышали их, что позволяет предположить стимулирующее действие слезозаменителя на метаболическую активность клеток лимба (рис.4).



**Рис. 4.** Уровень жизнеспособности клеток лимба роговицы (%) при внесении к ним последовательных разведений слезозаменителя «Стиллавит»

**Клиническая часть исследования.** *Начальный этап* включал в себя исследование с целью изучения характерных особенностей во всех слоях роговицы, возникающих до назначения гипотензивной терапии на фоне повышенного ВГД, что в последующем позволило провести анализ морфологических изменений, выявляемых на фоне длительного применения антиглаукомных препаратов и компенсации ВГД. При обследовании пациентов с первично установленным диагнозом глаукома (без медикаментозного режима), было установлено, что основные изменения, определяемые *при конфокальной микроскопии роговицы*, локализовались в средних и задних слоях стромы. Обследование пациентов на фоне длительного медикаментозного режима при компенсированном ВГД выявило максимальные изменения со стороны эпителия и передних слоев стромы роговицы. Состояние же средней и задней стромы, по сравнению с микроскопической картиной, получаемой при некомпенсированном ВГД и отсутствии медикаментозного режима, на фоне использования гипотензивной терапии улучшается.

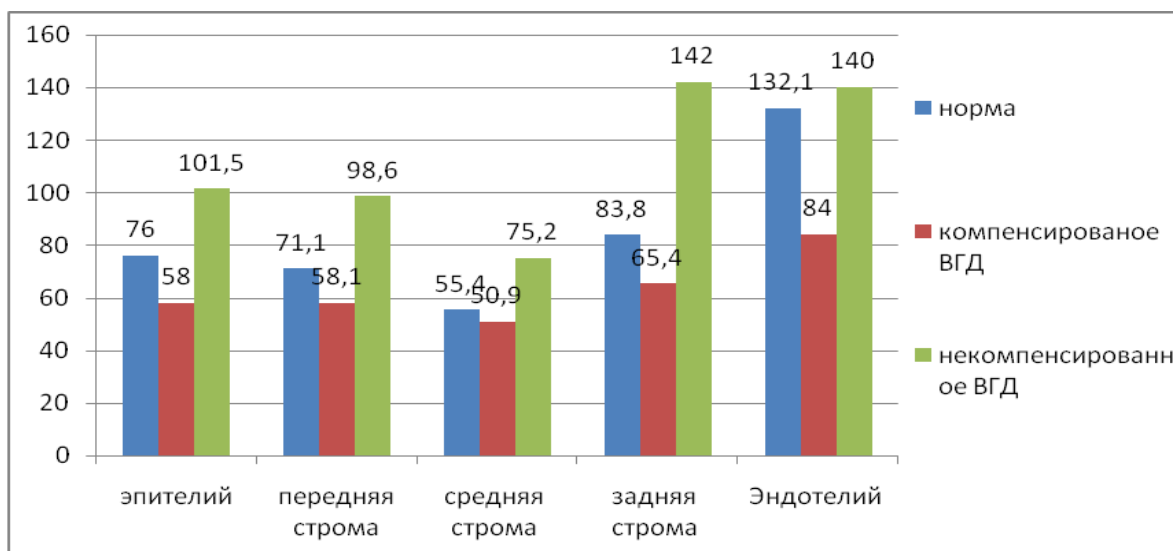
Результаты исследования *интенсивности светорассеяния* свидетельствовали о повышении данного показателя при некомпенсированном ВГД во всех слоях роговицы по сравнению с нормальными величинами ( $P < 0,05$ ). Наибольшие отклонения от нормы максимальной интенсивности светорассеяния наблюдали в задних слоях стромы роговицы. Увеличение составило 69,5%. Также значительно был превышен данный показатель в слое эпителия (33,5%) и передней строме (38,7%). Зарегистрировано также увеличение диапазона значений между максимальным и минимальным уровнем светорассеяния в задних слоях стромы в 4 раза, эпителии в 1,6, передней строме в 2,2 раза.

При компенсированном ВГД (на длительном медикаментозном режиме) выявлено некоторое снижение интенсивности светорассеяния, по сравнению с нормальными величинами. В передних и средних слоях роговицы снижение составило от 19,5 до 21,2%. В слое эпителия



минимальная интенсивность светорассеяния снизилась на 30,7%, максимальная – на 24%, в слоях задней стромы соответственно на 32% и 22%. При определенной сопоставимости степени снижения интенсивности светорассеяния в слоях стромы, наибольшая тенденция к снижению была отмечена в ее задних слоях, что являлось ожидаемым при компенсации ВГД. Рассеяние света от слоя заднего эпителия роговицы резко снизилось (61%), что может быть связано с уменьшением светорассеяния в предлежащих слоях стромы.

Зависимость интенсивности светорассеяния в различных слоях роговицы от компенсации ВГД при глаукоме демонстрирует гистограмма (Рис.5).



**Рис. 5. Уровень максимальной интенсивности светорассеяния роговицы в норме, при некомпенсированном и компенсированном ВГД при глаукоме.**

На втором этапе клинической части исследования была проведена оценка состояния глазной поверхности и уровня слезопродукции до и через 1, 3 и 6 месяцев на фоне применения слезозаменителя «Стиллавит» у 58 пациентов (116 глаз) с разным сроком длительности (от 2 мес. до 17 лет) использования антиглаукомных препаратов, содержащих в качестве консерванта БХ. Все обследованные пациенты до начала лечения отмечали выраженный дискомфорт. При биомикроскопии у 96 % пациентов были выявлены признаки гиперемии конъюнктивы и эпителиопатии роговицы в виде

точечных дефектов поверхностного слоя эпителия, как правило, с прокрашиванием при проведении флюоресцеинового теста ( $3,3 \pm 0,4$  балла по Оксфордской шкале).

Улучшение состояния эпителия роговицы было отмечено в 85% случаев на фоне использования слезозаменителя (соответствовало  $1,0 \pm 0,3$  баллам по Оксфордской шкале). В 15 % случаев не удалось справиться в достаточной степени с эпителиопатией, и дополнительно были назначены препараты, стимулирующие репаративную регенерацию: «Корнерегель» (Валеант, Россия, регистрационный №П N015841/01 от 30.09.2009); «Солкосерил» глазной гель (Меда Фарма, Россия, регистрационный №П N015224/02 от 19.11.2008); «ВитА-ПОС» (Ursapharm, Германия, регистрационный № ФЗС 2010/07471 от 02.08.2010).

Результаты исследования *основной слезопродукции и стабильности прекорнеальной слезной пленки* до назначения слезозаменителя «Стиллавит» и на фоне его применения приведены в таблице №1.

**Таблица №1**

**Стабильность прекорнеальной слезной плёнки (проба Норна), уровень общей слезопродукции (проба Ширмера) и уровень основной слезопродукции (проба Джонеса) до назначения слезозаменителя «Стиллавит» и на фоне его применения (Me(Lq;Uq)).**

Показатель	До назначения препарата	Через 1 мес	Через 3 мес	Через 6 мес	Уровень достоверности
Проба Норна (сек.)	10(9;12)	13(12;15)	17,50(15;19)	20(19;20)	$p < 0,05$
Проба Ширмера (мм)	9(8;9)	10(9;11)	12,5(12;13)	13(12;14)	$p < 0,05$
Проба Джонеса (мм)	5(4;6)	7(6;7)	8(8;8)	7,50(7;8)	$p < 0,05$

Отмечено статистически достоверное увеличение средних значений времени разрыва прекорнеальной слезной пленки по сравнению с исходным уровнем: через 1 мес. медикаментозной терапии – на 30 %, через 3 мес. – на 75%, через 6 мес. – результаты пробы увеличились в 2 раза. Повышение уровня общей слезопродукции составило: через 1 месяц медикаментозной терапии – на 11%, через 3 мес. – на 39%, через 6 мес. – на 44%. Отмечено повышение уровня базальной слезопродукции составило 40; 60 и 50 % соответственно ( $p < 0,05$ ).

По данным *ОКТ (менискометрии)* получены следующие данные высоты и ширины нижнего слезного мениска (Табл.2).

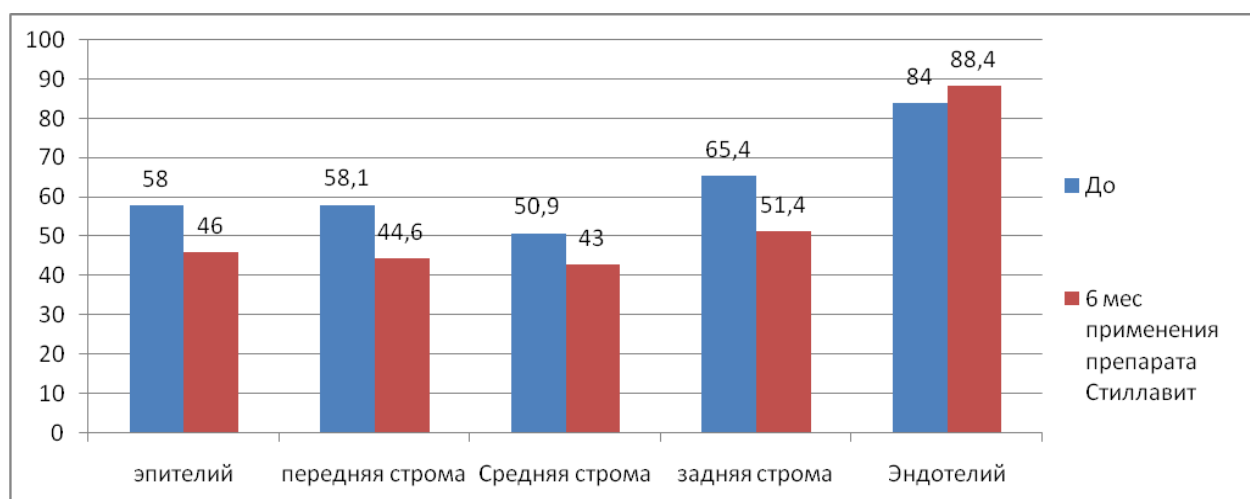
*Таблица №2*  
*Параметры нижнего слезного мениска до назначения слезозаменителя «Стиллавит» и на фоне его применения (Me(Lq;Uq)).*

Параметры	До назначения препарата	Через 1 мес	Через 3 мес	Через 6 мес
Высота нижнего слезного мениска	0,15(0,14;0,16)	0,17(0,15;0,19)	0,19(0,18;0,2)	0,21(0,2;0,22)
Ширина нижнего слезного мениска	0,11(0,11;0,12)	0,12(0,12;0,14)	0,14(0,13;0,15)	0,15(0,15;0,16)

Повышение высоты нижнего слезного мениска относительно исходного уровня отмечено через 1 мес. на 4%, через 3 мес. – на 27%, через 6 мес. – на 40%. Ширина слезного мениска в эти же сроки увеличилась на 9;18; и 27% соответственно. Разница по сравнению с исходными значениями была статистически достоверна ( $p < 0,05$ ).

*Исследование толщины липидного слоя прекорнеальной слезной пленки с помощью метода тиаскопии на фоне инстилляций слезозаменителя «Стиллавит» свидетельствует о выявленной положительной тенденции в виде увеличения относительной площади данного слоя при толщине 0,13–0,27 мкм на 5,7% и 0,27–0,5 мкм на 6,2% через 3 мес. Повышение данных показателей через 6 месяца использования слезозаместительной терапии составило 6,2 и 20% соответственно.*

С помощью метода *конфокальной микроскопии*, был подтвержден положительный эффект применения слезозаменителя «Стиллавит». Оценка интенсивности светорассеяния показала статистически значимое снижение как максимального, так и минимального уровня интенсивности светорассеяния в эпителиальных слоях и строме роговицы. Изменения в слое эндотелия не были статистически достоверны (Рис. 6). Наибольшее снижение максимальной интенсивности светорассеяния выявлено в слое эпителия (на 21%) и передней строме (на 23,2%) с уменьшением диапазона между максимальным и минимальным уровнем соответственно в 2 и 1,6 раза.



**Рис.6. Уровень интенсивности светорассеяния роговицы при компенсированном ВГД на длительном медикаментозном режиме и через 6 месяцев применения слезозаменителя «Стиллавит»**

Проведенные исследования *методом импрессионной цитологии* позволили выявить определенную закономерность развития дистрофических изменений в эпителии тарзальной и бульбарной конъюнктивы. При продолжительном закапывании (1-1,5лет) препаратов с консервантом наблюдали нарастание дистрофических изменений с увеличением степени полиморфизма эпителиоцитов бульбарной конъюнктивы, и ступенчатостью межклеточных границ, регистрировали также участки с полным отсутствием бокаловидных клеток. В ряде случаев была выявлена характерная особенность состояния эпителиальной выстилки в виде достаточно неоднородной цитологической картины различных участков конъюнктивы

с чередованием участков дистрофии при минимальной сохранности и плотности бокаловидных клеток с зонами выраженной плоскоклеточной метаплазии и появлением в цитоплазме зерен кератогиалина.

По мере увеличения длительности использования медикаментозных препаратов, степень дистрофических изменений в слоях конъюнктивального эпителия возрастала. На фоне использования слезозаменителя «Стиллавит» в комбинации с гипотензивными антиглаукомными препаратами наблюдали положительную динамику в состоянии эпителиальной выстилки конъюнктивы, клеточной дифференцировке и появлении бокаловидных клеток.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что использование средств слезозаменительной терапии и стимуляторов репаративной регенерации в комбинации с антиглаукомными препаратами, содержащими в качестве консерванта БХ, позволяет уменьшить их цитотоксическое воздействие на глазную поверхность и способствует восстановлению эпителиального слоя роговицы и конъюнктивы. Одновременно наблюдаются положительные сдвиги в состоянии стромы роговицы, что подтверждается данными конфокальной микроскопии.

### **ВЫВОДЫ**

1. На репрезентативном материале (122 пациента, 244 глаза) проведено исследование морфологических особенностей роговицы при глаукоме, детальная оценка состояния глазной поверхности при длительном использовании средств гипотензивной терапии (от 1 года до 17 лет) на основе комплекса современных информативных диагностических методов (конфокальная микроскопия роговицы, импрессионная цитология, усовершенствованный метод тиаскопии, ОКТ-менискометрия).

2. При экспериментальном исследовании (тест на выживаемость при воздействии на культуру клеток препарата латанопрост/БХ и хлорида бензалкония при концентрации, обеспечивающей их метаболическую активность), было установлено, что выживаемость клеток составила от 9,2 до

114% в зависимости от концентрации испытуемых компонентов (от 6,25 до 0,098%) при отсутствии статистически значимой разницы между значениями ( $P > 0,05$ ). Коэффициент корреляции между этими совокупностями составил 0,98, что свидетельствует о том, что в условиях кратковременного воздействия на культуру клеток токсический эффект препарата обусловлен наличием в его составе хлорида бензалкония.

3. В условиях эксперимента уровень выживаемости клеток при воздействии препарата (латанопрост/БХ) в концентрации 6,25% составил 68,49%. Снижение количества жизнеспособных клеток по сравнению с контролем - 31,5%. Установлено, что предварительное (за 30 минут до внесения препарата (латанопрост/БХ), и одновременное добавление Стиллавита увеличивает показатели выживаемости клеточной культуры до 94,95 и 103,8% соответственно. Наблюдаемые различия статистически значимы ( $p > 0,05$ ). Протекторный эффект на выживаемость клеток и его положительное влияние на их миграцию слезозаменителя «Стиллавит» подтвержден данными цитологических методов.

4. По данным конфокальной микроскопии при некомпенсированном ВГД морфологические нарушения с признаками хронического отека локализуются в основном в задних и средних отделах стромы роговицы. При компенсации ВГД на фоне длительного медикаментозного лечения, степень данных нарушений снижается с одновременным нарастанием степени эпителиопатии и структурных изменений в передних слоях стромы со снижением ее прозрачности и явлениями гомогенизации.

5. Следствием морфологических нарушений является изменение интенсивности светорассеяния компонентами роговичной ткани. Показатель интенсивности светорассеяния может быть использован в качестве дополнительного критерия для оценки морфологических изменений роговицы при воздействии различных неблагоприятных, повреждающих факторов, а также оценки эффективности использования медикаментозных средств. После 6 месяцев применения слезозаменителя «Стиллавит»

совместно с офтальмогипотензивной терапией выявлено наибольшее снижение максимальной интенсивности светорассеяния в эпителиальном слое роговицы (на 21%) и передней строме (на 23,2%).

6. Доказана целесообразность применения слезозаменительной терапии и средств репаративной регенерации в комбинации с офтальмогипотензивными препаратами, содержащими бензалкония хлорид с целью снижения его токсического воздействия на глазную поверхность. Их использование позволяет снизить степень эпителиопатии роговицы и метаплазии эпителия конъюнктивы, повысить стабильность прекорнеальной слезной пленки через 6 месяцев в два раза от исходных значений, уровень общей слезопродукции на 44% и уровень базальной слезопродукции на 50%; получить положительные качественные изменения липидного слоя слезной пленки, как следствие увеличение высоты и ширины слезного мениска на 40% и 27% соответственно.

7. На основе полученной доказательной базы обоснованы показания и разработан алгоритм применения слезозамениителя «Стиллавит» в комбинации с гипотензивными препаратами, содержащими бензалкония хлорид, определены оптимальные сроки его использования.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. У пациентов с глаукомой необходимо проводить оценку состояния глазной поверхности и выявлять наличие признаков ССГ до назначения офтальмогипотензивной терапии.

Помимо рутинных методов исследования целесообразно использовать такие методы, как конфокальная микроскопия, ОКТ-менискометрия, усовершенствованный метод тиаскопии.

2. В случае выявления признаков ССГ у пациентов находящихся на офтальмогипотензивной терапии, рекомендовано добавление слезозаменительной терапии без консервантов или с консервантом, обладающим низкой цитотоксичностью.

Слезозаменитель «Стиллавит» рекомендовано инстиллировать за 10-15 минут до офтальмогипотензивного препарата. Минимальный срок применения слезозаменителя для достижения максимального эффекта 3- 6 месяцев. В дальнейшем необходима поддерживающая слезозаменительная терапия 1-2 раза в год.

3. При выраженных признаках ССГ, эпителиопатии роговицы и недостаточной эффективности слезозаменительной терапии необходимо дополнительно использовать стимуляторы репаративной регенерации 2 раза в день до достижения максимального результата. В последующем может быть рекомендовано их применение 1 раз в день в качестве поддерживающей терапии в течение длительного периода или постоянно.

4. Слезозаменительная терапия у больных глаукомой, использующих препараты, содержащие консерванты, в частности БХ, может быть использована с профилактической целью, для предотвращения морфофункциональных нарушений глазной поверхности.

5. При наличии уже имеющихся признаков ССГ у пациентов с впервые выявленной глаукомой предпочтение следует отдавать офтальмогипотензивным препаратам, не содержащим консервант в своем составе.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Егорова Г.Б., Федоров А.А., Аверич В.В. Морфологические изменения при глаукоме на фоне повышенного ВГД и при длительной гипотензивной терапии по результатам конфокальной микроскопии роговицы// **РМЖ. Клиническая офтальмология. - 2018. - Т.15. - №3. – С. 113-117.**

2. Егорова Г.Б., Еричев В.П., Суббот А.М., Федоров А.А., Нестерова Т.В., Габашвили А.Н., Аверич В.В. Оценка возможностей снижения токсического действия антиглаукомного гипотензивного препарата, содержащего консервант бензалкония хлорид на первичную культуру клеток лимба роговицы с помощью препарата Стиллавит (экспериментальное исследование)// **Национальный журнал «Глаукома». - 2017. - Т. 16. - № 4. - С. 31-36.**

3. Егорова Г.Б., Федоров А.А., Аверич В.В. Импрессионная цитология конъюнктивального эпителия глаукомных больных, длительно применявших



гипотензивные препараты, содержащие консерванты// XVI Всероссийская школа офтальмолога. Сборник научных трудов. - 2017. - С. 53-57.

4. Егорова Г.Б., Аверич В.В., Нестерова Т.В., Габашвили А.Н. Исследование цитотоксичности консерванта - бензалкония хлорида (в составе препарата «Пролатан») и протекторного действия препарата «Стиллавит» на культуре клеток лимбального эпителия роговицы// XVI Всероссийская школа офтальмолога. Сборник научных трудов. - 2017. - С. 49-52.

5. Егорова Г.Б., Аверич В.В. Интенсивность светорассеяния роговицы, как критерий оценки эффективности применения слезозаменителя «Стиллавит» в комбинации с гипотензивными антиглаукомными средствами// XVII Всероссийская школа офтальмолога. Сборник научных трудов. - 2018. - С. 67-74

6. Егорова Г.Б., Аверич В.В. Оценка морфологических изменений и уровня светорассеяния роговицы при глаукоме по данным конфокальной микроскопии роговицы // **РМЖ. Клиническая Офтальмология. - 2018. - №1. С. 1-6**

7. Егорова Г.Б., Аверич В.В. Снижение цитотоксического действия консерванта в составе офтальмогипотензивных препаратов с помощью слезозаместительной терапии // **Вестник офтальмологии. – 2018. – Т.134. - №3. – С.48-56.**

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ССГ – синдром сухого глаза

СП – слезная пленка

ВРСП – время разрыва слезной пленки

ВГД – внутриглазное давление

ОКТ – оптическая когерентная томография

ПОУГ – первичная открытоугольная глаукома

БХ – бензалкония хлорид

ПКТ – персонализированная клеточная терапия

ДЗН – диск зрительного нерва

сГАГ – сульфатированные гликозаминогликаны

Lasik (Laser-Assisted in Situ Keratomileusis) – лазерный кератомилез

ФЭК – факоэмульсификация катаракты

ЭДТА – Этилендиаминтетрауксусная кислота

МТС – реагент (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)- 2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолиум)

АРС – антиген-презентирующие клетки

ММР – матриксные металлопротеиназы