

На правах рукописи

Казакова Ксения Александровна

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ
ПРИМЕНЕНИЯ ДИОДНОГО ЛАЗЕРНОГО КОАГУЛЯТОРА 1,44 МКМ В
ЛЕЧЕНИИ ЯЗВЫ РОГОВИЦЫ**

14.01.07. – глазные болезни

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2015 г.

Работа выполнена на кафедре глазных болезней Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Фролов Михаил Александрович

Официальные оппоненты:

Бржеский Владимир Всеволодович – доктор медицинских наук, профессор, ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, заведующий кафедрой офтальмологии.

Слонимский Юрий Борисович – доктор медицинских наук, доцент, ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Министерства здравоохранения РФ, профессор кафедры офтальмологии.

Ведущая организация:

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф.Владимирского.

Защита состоится «30» ноября 2015 г. в 14-00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.040.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт глазных болезней», по адресу: 119021, г. Москва, ул. Россолимо, д.11, кор. А, Б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.niigb.ru Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт глазных болезней».

Автореферат разослан «___» _____ 2015г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Иванов М.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности. Во всем мире около 285 млн. человек страдают от нарушений зрения, из которых 45 млн. поражены слепотой и 240 млн. имеют пониженное зрение (ВОЗ Информ. бюллетень №282, октябрь 2013). Заболевания роговицы в структуре глазной патологии составляют около 35% (Душин Н.В., 1990) и являются серьезной социальной проблемой, так как в основном поражают трудоспособное население, приводят к значительному временному или стойкому снижению остроты зрения вплоть до полной утраты зрительных функций и, следовательно, к затруднению социальной адаптации и резкому снижению качества жизни пациентов. Ежегодно в мире от 1,5 до 2 млн. человек получают монокулярную слепоту в связи с язвами и травмами роговицы (Репях В.С., 2003; Полунин Г.С., 2004). Язва роговицы по своим последствиям является вторым после герпетического кератита инвалидизирующим заболеванием роговицы, отличающимся клинической тяжестью, скоротечностью и часто приводящим к гибели глаза вследствие развития эндофтальмита (Каспаров А.А., 1987, 2005, 2007). Несмотря на достижения современной медицины лечение язв роговицы остается крайне сложным процессом. Применяют консервативные, хирургические, а также физиотерапевтические методы. На первом этапе основным методом лечения является медикаментозная терапия с учётом этиологии язвы роговицы. Однако полиморфизм этиологических факторов, часто встречающаяся нетипичная клиническая картина, развитие резистентности микроорганизмов к лекарственным средствам значительно снижают эффект проводимого консервативного лечения. В комплексе с медикаментозной терапией применяют методы локального воздействия на язву: электрокоагуляция (Шилин Я.В., 1947) диатермокоагуляция (Каспаров А.А., 1987, 1994), модифицированная микродиатермокоагуляция (Зайцев А.В., 2014 г.), лазерная коагуляция роговицы (Hallman, 1968; Fromer и L'Esperance, 1971; Краснов М.М., 1972; Большунов А.В., 1976, 1985, 2009; Szafik, 1982, Корниловской И.М., 1990, Бойко Э.В., 2007, 2009, 2010; Pellegrino F., 2013). Для

стимуляции процессов заживления роговицы и усиления действия лекарственных препаратов активно используют физиотерапевтические методы: фонофорез (Цок Р.М.,1980; Наджем Аднам, 1988), магнитофорез (Митбрейт М.И., 1980; Киселев Т.А., 1997) лазерное лечение (Скобелкин О.К., 1997; Watson P.G., 2000; Баларев А.Ю., 2006, Раднаева Д.Ц., 2007). При тяжелых формах, осложненном течении язв применяют хирургические методы лечения: от покровной пластики аутоконъюнктивой до сквозной пересадки роговицы. В последние десятилетия особое внимание уделяется развитию инновационных методов лечения. К таким методам относится и использование лазеров, обладающих высокой биологической активностью. Механизм терапевтического воздействия лазеркоагуляции связан с бактерицидным и вирусоцидным эффектами, обусловленными высокой (до 80-100°C) температурой в очаге коагуляции роговичной ткани, а также со стимулирующим действием лазерного излучения на репаративные процессы роговицы.

Цель исследования: экспериментально обосновать и разработать метод лечения язв роговицы с использованием диодного лазерного коагулятора ближнего инфракрасного диапазона с длиной волны 1,44 мкм и применить разработанный метод в клинических условиях.

Задачи исследования:

1. Изучить *in vitro* морфологические изменения роговицы при воздействии на нее лазерного излучения с длиной волны 1,44 мкм при различных энергетических параметрах (изолированные бычьи глаза).
2. Изучить воздействие лазерного излучения с длиной волны 1,44 мкм при различных энергетических параметрах на роговицу *in vivo* в остром и хроническом опыте (роговица лабораторных животных).
3. На основании полученных данных определить энергетические параметры исследуемого лазерного излучения на длине волны 1,44 мкм, эффективные для воздействия на роговицу и при этом безопасные для глубжележащих тканей.
4. Выявить и проанализировать клинико-морфологические особенности течения экспериментально созданной бактериальной язвы роговицы при

применении лазерного излучения на длине волны 1,44 мкм для лечения язвенного поражения.

5. Применить исследуемый лазерный коагулятор на длине волны 1,44 мкм в клинических условиях для лечения язв роговицы и оценить его эффективность на основании сравнительной оценки клинико-функциональных результатов комплексного лечения, включающего лазерное воздействие, с результатами традиционного консервативного лечения язв роговицы.

Научная новизна

1. Впервые изучено влияние лазерного излучения при длине волны 1,44 мкм на роговицу лабораторных животных в остром и хроническом опыте при различных энергетических параметрах.

2. В эксперименте разработана технология лечения язв роговицы с применением лазерного излучения на длине волны 1,44 мкм. Морфологические исследования подтвердили эффективность, безопасность используемого лазерного излучения и возможность его применения для коагуляции язвенного дефекта и для стимуляции репаративных процессов роговицы.

3. Разработанный метод лечения язв роговицы с использованием лазерного излучения на длине волны 1,44 мкм впервые применен в клинических условиях; проведена оценка его эффективности по сравнению с традиционным консервативным лечением.

Теоретическая и практическая значимость работы

1. На основании результатов экспериментальной части исследования определены конкретные энергетические параметры лазерного коагулятора с длиной волны 1,44 мкм, позволяющие провести достаточную по глубине коагуляцию роговицы и при этом не повреждающие глубокие слои (задняя пограничная мембрана и эндотелий).

2. Экспериментально разработан и применен в клинике комплексный метод лечения язв роговицы, включающий лазерную коагуляцию язвенного очага и последующее низкоинтенсивное биостимулирующее лазерное воздействие в комплексе с традиционным консервативным лечением.

3. Разработанный комплексный метод лечения язв роговицы с использованием лазерного излучения на длине волны 1,44 мкм внедрен в клиническую практику кафедры глазных болезней ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» и многопрофильного медицинского холдинга ООО «СМ-клиника».

4. Материалы диссертации включены в учебную программу кафедры глазных болезней медицинского института и офтальмологии факультета повышения квалификации медицинских работников ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (г. Москва).

Методология и методы исследования. Методологической основой диссертационной работы явилось последовательное применение методов научного познания. Работа выполнялась по классическому типу построения научного исследования, основанного на принципах доказательной медицины. Основным научным методом данного диссертационного исследования являлся эксперимент. Работа выполнена в дизайне проспективного открытого исследования с проведением экспериментальной части и клинических испытаний. Для сбора данных и анализа результатов исследования использовали как количественные, так и качественные методы, включающие стандартные и дополнительные (конфокальная микроскопия, анализ биомеханических свойств роговицы) методы исследования в офтальмологии, лабораторный метод исследования (бактериологический), морфологическое исследование с морфометрическим анализом, статистическую обработку результатов с использованием критериев достоверности для малых выборок.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Экспериментально подтверждено, что при воздействии на роговицу лазерным излучением с длиной волны 1,44 мкм в зависимости от выбранных энергетических параметров можно добиться различной степени выраженности термического эффекта: от незначительного нагревания ткани, вызывающего минимальные морфологические изменения, до коагуляционного некроза.

2. Экспериментально обоснованы энергетические параметры безопасного и эффективного лазерного воздействия с длиной волны 1,44 мкм на роговицу

лабораторных животных. Наиболее оптимальными энергетическими параметрами для проведения эффективной лазерной коагуляции язвенного дефекта роговицы, не оказывающими повреждающего воздействия на глубжележащие структуры (задняя пограничная мембрана, эндотелий) являются: мощность излучения 0,25 Вт и длительность импульса 0,79 сек, энергия излучения 0,231 Дж.

3. Результаты морфологических исследований показали, что сочетание лазерной коагуляции язв роговицы с последующим низкоинтенсивным лазерным воздействием на язву в течение 3-5 дней с мощностью лазерного излучения 0,15 Вт и длительностью импульса 0,11 сек в комбинации с традиционной консервативной терапией способствует формированию более нежного рубца, близкого по структуре к здоровой роговице.

4. Применение лазерной коагуляции язв роговицы, особенно в комбинации с последующим низкоинтенсивным лазерным воздействием, в комплексном лечении язв роговицы повышает эффективность лечения: сокращает сроки полной эпителизации и позволяет добиться менее интенсивного помутнения роговицы, чем при традиционном консервативном лечении.

Внедрение результатов исследования. Разработанный метод лечения язв роговицы с применением лазерного излучения на длине волны 1,44 мкм внедрен в клиническую практику кафедры глазных болезней в отделении микрохирургии глаза ГКБ № 12 города Москвы и офтальмологического кабинета многопрофильного медицинского холдинга «СМ-МЕД». Материалы диссертационного исследования используются на кафедре глазных болезней РУДН при подготовке студентов, ординаторов, аспирантов.

Личный вклад автора. Автором определены цели и задачи исследования. Лично осуществлялись все этапы эксперимента. Автор принимала участие во всех морфологических и клинических исследованиях. Получение и статистическая обработка всех данных исследований, апробация результатов исследований, подготовка публикаций и докладов по выполненной работе выполнены лично автором.

Степень достоверности и апробация работы. Степень достоверности проведенных результатов исследований определяется репрезентативностью результатов морфологических исследований экспериментальной части, а также достаточным набором современных методов исследования, используемых в клинической части. Статистическая обработка результатов исследований проводилась строго с использованием критериев и формул для малых выборок. Основные материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на заседаниях кафедры глазных болезней медицинского института Российского университета дружбы народов; III Международной студенческой научно-практической конференции с участием молодых ученых (Москва, РУДН, 2011); XI Международном конгрессе «Здоровье и образование в XXI веке» «Научные и прикладные аспекты-концепции здоровья и здорового образа жизни» (Москва, РУДН, 2011); VIII Всероссийской научной конференции молодых ученых с участием иностранных специалистов "Актуальные проблемы офтальмологии» (Москва, МНТК Микрохирургии глаза им. С.Н. Федорова, 2013); международной конференции «Научные исследования и их практическое применение. Современное состояние и пути развития 2013» (интернет-конференция проект SWorld, 2013); VII Российском общенациональном офтальмологическом форуме, РООФ 2014 (Москва, 2014), научной конференции, посвященной 50-летию юбилею кафедры глазных болезней РУДН «Офтальмология: итоги и перспективы» (Москва, 12 марта 2015).

Публикации. По теме диссертационного исследования опубликовано 11 работ, в том числе 1 в зарубежной печати, и 3 – в изданиях, рекомендованных ВАК Минобразования РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 127 страницах машинописного текста, иллюстрирована 9 таблицами, 9 графиками, 26 рисунками, 11 фотографиями. Работа состоит из введения, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы, включающего 240 источников, из которых 186 отечественных, 54 иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Исследования проведены на кафедре глазных болезней РУДН и включали в себя серию экспериментов и клиническую часть. В качестве источника лазерного излучения использовали разработанный в Институте общей физики им. А.М.Прохорова АН РФ макетный образец лазерного коагулятора с длиной волны 1,44 мкм на основе полупроводникового лазера с волоконным выводом излучения. Диаметр сердцевины кварцевого волокна составляет 600 мкм. Конец волоконного вывода излучения лазера располагался перпендикулярно к поверхности роговицы на расстоянии 1 мм. На конце волоконного наконечника использовали специальный силиконовый ограничитель, обеспечивавший во всех экспериментах одинаковое расстояние от конца волокна до поверхности роговицы. Мощность выходного излучения от 0,15 до 0,27 Вт. Режим работы: импульсный, непрерывный. Длительность импульса от 0,11 до 2,95 сек. Энергия излучения на выходе от 0,0165 до 0,797 Дж.

Экспериментальная часть состояла из трех этапов. На первом этапе изучали воздействие лазерного излучения с длиной волны 1,44 мкм на роговицы изолированных бычьих глаз. Эксперимент проводили на 6 бычьих глазах, энуклеированных через 5-6 часов после смерти животного. Облучение роговицы осуществляли импульсами при изменении значений мощности (0,15-0,27 Вт) и длительности излучения (0,37, 1,3, 2,9 сек). После облучения вырезали кусочки роговицы в зоне лазерного воздействия размерами 0,5 x 0,5 см, обезвоживали в спиртах и заливали в смолу (эпон-аралдит). Проводили гистологическое исследование и морфометрический анализ.

На втором этапе изучали воздействие лазерного излучения с длиной волны 1,44 мкм при различных энергетических параметрах на интактные роговицы лабораторных животных. Эксперимент проводили на 6 глазах половозрелых кроликов породы Schinschilla массой 1,5-2,0 кг. После инстилляций местных анестетиков проводили однократное облучение центральной зоны роговицы в импульсном режиме с заданными значениями

мощности и длительности излучения. Использовали два режима энергетических параметров: $P=0,270$ Вт, $t=0,95$ сек и $P=0,15$ Вт, $t=1,3$ сек. Соответственно сформировали 2 группы наблюдения. Оценивали соматический и офтальмологический статус до и после лазерного воздействия. Животных первой группы выводили из опыта на 1, 7 и 16 день после лазерной коагуляции роговицы, второй группы – на 1, 5, 9 сутки. Энуклеированные глаза животных фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина. Проводили гистологическое исследование и морфометрический анализ.

На третьем этапе изучали применение лазерного излучения на длине волны 1,44 мкм для лечения язв роговицы в эксперименте. Исследование проводили на 22 глазах половозрелых кроликов породы Schinschilla массой 1,5-3,0 кг. Была получена модель бактериальной язвы роговицы в центральной зоне путем интрастромального введения бульонной культуры *St.aureus*. Для инфицирования роговицы вводили около 0,2-0,3 мл культуры. Лечение начинали после развития экссудативно-деструктивного воспаления. Сформировали 3 группы наблюдения: I – 4 кролика (8 глаз): животным данной группы, наряду с инстилляцией раствора антибиотика 4 р/д, выполнена лазерная коагуляция язвенного дефекта по всей его площади $P=0,27$ Вт, $t=0,95$ сек (2 глаза), $t=0,79$ сек (2 глаза), $P=0,25$ Вт, $t=0,95$ сек (2 глаза), $t=0,79$ сек (2 глаза). II группа – 4 кролика (8 глаз): в данной группе наряду с антибиотикотерапией и лазерной коагуляцией по схемам, аналогичным I группе, проводили низкоинтенсивное лазерное облучение воспалительного очага при $P=0,15$ Вт, $t=0,11$ сек в течение 4 дней, начиная со 2-х суток после проведения лазерной коагуляции язвы. III группа – контроль - 3 кролика (6 глаз): животным выполняли только инстилляции раствора ципрофлоксацина с частотой 4 р/д. Оценивали соматический и офтальмологический статус до и после лазерного воздействия, сроки купирования воспалительных симптомов: гиперемия конъюнктивы, наличие отделяемого, а также сроки полной эпителизации роговицы. Проводили бактериологическое исследование. Всех экспериментальных животных выводили из опыта на 14 сутки после

проведения лазерной коагуляции язвенного дефекта. Энклеированные глаза кроликов фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина на фосфатном буфере. Морфологическое исследование проводили методом полутонких срезов (толщиной 1-1,5 мкм), исследовали на «Фотомикроскопе III» (Opton, Германия). Фоторегистрацию и морфометрический анализ изображений проводили с помощью программного обеспечения фирмы «Мекос».

В клиническую часть исследования вошло 25 пациентов с язвами роговицы различной этиологии: бактериальная, вирусные и грибковые с вторичным инфицированием. Критерием исключения были вирусные язвенные кератиты без подозрения на вторичную бактериальную инфекцию. В исследование вошли пациенты с язвенными дефектами с глубиной поражения не более 2/3 стромы в случаях парацентрального и периферического поражения, при центральном расположении - не более 1/2 глубины стромы.

Возраст пациентов обеих групп колебался от 27 до 81 года. Средний возраст составил 54,56 года. Мужчин было 6, женщин – 19. В основной группе средний возраст составил 52,3 года. Мужчин – 2, женщин – 8. В контрольной группе средний возраст составил 57,73 года. Мужчин 4, женщин - 11. Основная группа – 10 пациентов (10 глаз) – была разделена на подгруппы: в подгруппе А – 5 пациентов (5 глаз) однократно выполняли лазерную коагуляцию язвы $P=0,25$ Вт, $t=0,79$ сек, а также проводили традиционную консервативную терапию язвы роговицы (системное и местное применение антибактериальных и/или противовирусных препаратов, противовоспалительных средств, препараты, стимулирующие репаративные процессы). В подгруппе Б – 5 пациентов (5 глаз) – наряду с консервативной терапией осуществляли лазерную коагуляцию язвы и последующие 2-4 сеанса биостимулирующего лазерного воздействия с $P=0,15$ мВт, $t=0.11$ сек с целью стимуляции процессов заживления. Группа контроля включала 15 пациентов с язвами роговицы, получавших только консервативную терапию. Оценивались сроки купирования роговичного синдрома и стихания воспалительной реакции,

начало эпителизации роговицы, средние сроки полной эпителизации язвы, наличие осложнений, степень помутнения роговицы.

Методы исследований: визометрия, авторефрактометрия (Nidek, Япония и Righton Speedy-K, Япония), пневмотонометрия (Rodenstock, Германия, Tonometer TX-10 Canon, Япония), биомикроскопия (Takagi, Япония, ЛС-01-Зенит, Россия), прямая офтальмоскопия (Riester, Германия, Neitz, Япония) и/или на щелевой лампе с линзой 60, 78 D. Флюоресцеиновую пробу проводили с помощью одноразовых полосок Fluo strips (Индия). Бактериологическое исследование с определением чувствительности к основному спектру антибиотиков. Ряду пациентов проводили исследование биомеханических свойств роговицы на аппарате Ocular Response Analyzer (ORA, Reichert Inc., США), а также конфокальную микроскопию роговицы на аппарате ConfoScan 4 Nidek (Япония). Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми статистическими методами. Достоверность различий определяли с использованием t-критерия Стьюдента для малых выборок. При сравнении 3 групп наблюдения достоверность различия проверяли с помощью табличного критерия Ньюмена–Кейлса.

Результаты экспериментальных исследований: Результаты первого этапа эксперимента на роговицах изолированных бычьих глаз показали, что в зависимости от выбранных энергетических параметров, можно добиться различной степени выраженности термического эффекта: от незначительного нагревания ткани до коагуляционного некроза (Рис. 1, 2).

Рис.1

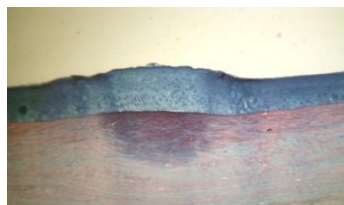


Рис. 2

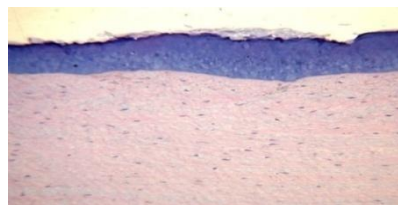


Рис. 1. $P=0,25$ Вт, $t = 2.9$ сек. Зона коагуляционного некроза стромы без признаков карбонизации.

Рис. 2. $P=0,15$ Вт, $t = 0.37$ сек. Отсутствие термического повреждения стромы.

Ни в одном из препаратов не было обнаружено изменений со стороны средних и глубоких стромальных слоев, а также заднего эпителия роговицы.

На втором этапе экспериментального исследования изучали воздействие лазерного излучения с длиной волны 1,44 мкм на интактную роговицу лабораторных животных (кроликов). Лазерная коагуляция роговиц кроликов не приводила к каким-либо изменениям в их поведении и соматическом статусе: частота дыхательных движений до облучения составляла $109,2 \pm 0,75$, после $109 \pm 0,63$ и сердечных сокращений до облучения $155 \pm 1,74$, после $156,6 \pm 0,77$, динамика статистически менялась незначительно ($p > 0,05$). После облучения на всем сроке наблюдения у одного кролика на следующие сутки после лазерной коагуляции появилась умеренно выраженная поверхностная инъекция конъюнктивы, которая самостоятельно купировалась в течение следующих суток. В 1 группе при воздействии лазерным излучением при $P=0,25$ Вт, $t=2,9$ сек произошла денатурация стромальной ткани, ее контракция и постепенное замещение новыми компонентами (пролиферация кератоцитов, гиперплазия эпителия, ретрокорнеальная мембрана) для воссоздания прежней архитектоники стромы (Рис. 3,4).

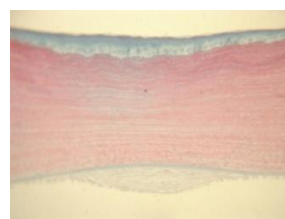
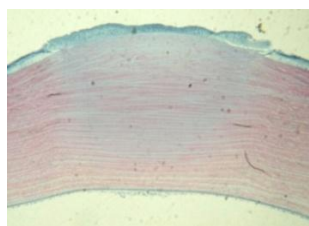


Рис. 3. I группа, 1 сутки после лазерной коагуляции Рис. 4. I группа, 16 сутки

Во 2 группе ($P=0,15$ Вт, $t=1,3$ сек) наблюдали морфологическую картину, характерную для термического эффекта лазерного воздействия без признаков коагуляции ткани. Через сутки после коагуляции в верхней трети стромы наблюдали очаг в виде неправильной пирамиды с пологим куполом глубиной 52,9 мкм с отечными, жизнеспособными кератоцитами. Эпителий в зоне воздействия в состоянии, близком к коагуляционному некрозу. Отдельные эндотелиальные клетки увеличены за счет отека, без грубых изменений (Рис.5). К 9 суткам наблюдали утолщение передних слоев эпителия. В строме в проекции лазерного воздействия отмечается пролиферация кератоцитов. Средние и глубокие слои стромы не изменены. Нежная ретрокорнеальная

мембрана, полностью покрытая неизменными эндотелиальными клетками. Отсутствие гидратации задних слоев стромы свидетельствует о сохранении барьерных свойств эндотелия (Рис. 6).

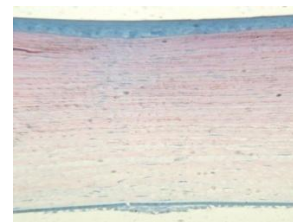
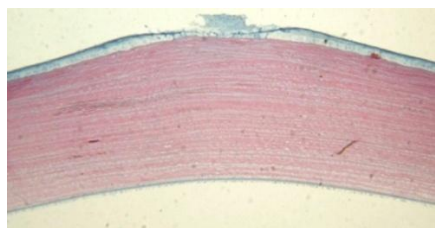


Рис. 5. II группа, 1 сутки после лазерного воздействия. Рис. 6. II группа, 9 сутки.

Морфологическая картина роговицы через различные сроки после лазерной коагуляции подтвердила возможность применения исследуемого лазерного излучения как с коагуляционной, так и с терапевтической (стимуляция пролиферации кератоцитов) целью. На основании полученных результатов были выбраны энергетические параметры лазерного коагулятора для лечения экспериментальной язвы роговицы лабораторных животных.

На третьем этапе исследований изучали возможность применения лазерного излучения с $\lambda = 1,44$ мкм для лечения экспериментальной язвы роговицы. В таблице 1 указаны энергетические параметры, используемые в эксперименте.

Таблица № 1. Энергетические параметры лазерного коагулятора $\lambda=1,44$ мкм при лечении экспериментальной язвы роговицы

Лазерное воздействие	Количество глаз кролика в	I группа (8 глаз)		II группа (8 глаз)	
		Мощность, Вт	Длительность импульса, сек	Мощность, Вт	Длительность импульса, сек
Коагуляция язвенного очага	2	0,25	0,79	0,25	0,79
	2	0,25	0,95	0,25	0,95
	2	0,27	0,79	0,27	0,79
	2	0,27	0,95	0,27	0,95
Лазерная стимуляция	8	Не проводилась	Не проводилась	0,15	0,11

Сравнительная характеристика клинических проявлений течения язвы роговицы по группам показала более быстрое купирование симптомов воспаления в опытных группах. Смешанная инъекция в I группе сохранялась в среднем до $5 \pm 0,76$ дней, во II группе в среднем исчезала на $4,25 \pm 0,71$ сутки, в

группе контроля сохранялась до $7,1 \pm 0,98$ дней ($\alpha < 0,05$). Слизисто-гнойное отделяемое в I группе сохранялось в среднем до $4,38 \pm 1,03$ дней, во II группе отделяемое сохранялось в среднем до $3,25 \pm 0,92$ дней, тогда как в группе контроля до $6,0 \pm 0,89$ дней ($\alpha < 0,05$). Средние сроки эпителизации роговицы после начала лечения в первой группе составили $6,25 \pm 0,92$ суток, во второй группе $5,25 \pm 0,46$ суток. В группе консервативного лечения явления эпителизация поверхностного дефекта происходила на $9 \pm 1,26$ сутки ($\alpha < 0,05$). На диаграмме 1 представлены сводные данные по средним срокам купирования симптомов воспаления в экспериментальных группах и группе контроля.



Диаграмма 1. Средние сроки купирования симптомов воспаления, дни.

Бактериологический контроль также показал более высокую эффективность комбинации антибактериальной терапии и лазерной коагуляции язвенного дефекта (Диаграмма 2).

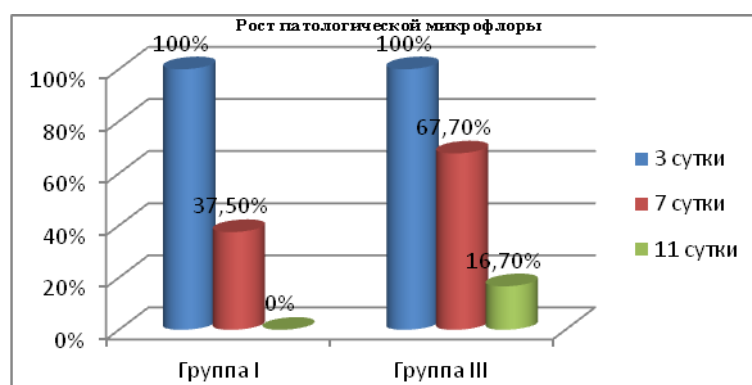


Диаграмма 2. Результаты бактериологического исследования.

На 3 сутки (до начала лечения) микрофлора определялась в 100% в обеих группах. В I группе на 7-е сутки от начала эксперимента, т.е. на 4 сутки после проведения лазерной коагуляции, рост микроорганизмов определялся в 37,5%

случаев, на 11-е сутки – отсутствовал во всех посевах. В группе контроля – рост бактерий на 7-е сутки определялся в 67,7%, на 11-е сутки сохранялся в 16,7% случаев.

По данным гистологических исследований, в контрольной группе на момент выведения животных из опыта сохранялась картина диффузного кератита с интенсивной инфильтрацией очага воспалительными клетками: лейкоцитами и макрофагами, активным рост новообразованных сосудов. При лазерной коагуляции в I и II опытных группах при $P=0,27$ Вт и $0,25$ Вт и $t=0,95$ сек лазерное излучение оказывало повреждающее воздействие, результатом которого стало выраженное уменьшение толщины роговицы в зоне воздействия и дефект эндотелия. При снижении дозы облучения морфологическая картина была более благоприятной. Так, в I опытной группе ($P=0,25$ Вт, $t=0,79$ сек, $E=0,197$ Дж) наблюдали заместительную гиперплазию эпителия, расположенного в 6-7 слоев и заполняющего язвенный дефект. Субэпителиально - слой молодой соединительной ткани, отличающейся по своему строению от неизменной стромальной ткани гиперцеллюлярностью и большей плотностью фибробластоподобных клеток, ткань рыхлая, более гидратированная, с признаками стромальной. Идет активная пролиферация соединительной ткани: кератобласты формируют пластины, параллельные основным пластинам стромы, но волокна незрелые, расположены с увеличенными промежутками, т.е. идет активное восполнение стромального дефекта. Глубжележащая строма не изменена. Эндотелий в зоне воздействия интактен (Рис.7).

Рис. 7.

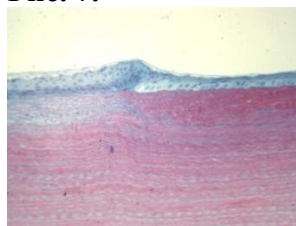


Рис.8

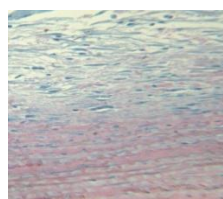


Рис. 7. Заместительная гиперплазия эпителия, субэпителиально - молодая гидратированная соединительная ткань с признаками стромальной. Глубжележащая строма не изменена.

Рис. 8. Гиперцеллюлярность поверхностных слоев стромы за счет фибробластоподобных клеток. Фибробласты параллельны поверхности роговицы.

В II опытной группе, где помимо лазерной коагуляции ($P=0,25$ Вт, $t=0,79$ сек) проводили последующее низкодозированное лазерное облучение воспалительного очага ($P=0,15$ Вт, $t=0,11$ сек) в течение 4 дней на 14 сутки от начала эксперимента в очаге эпителий сохранен, в строме гиперцеллюлярность поверхностных слоев за счет фибробластоподобных клеток. Фибробласты параллельны поверхности роговицы, что свидетельствует о хорошем прогнозе на заживление и восстановление оптических свойств. Встречаются отдельные воспалительные клетки. Глубокие слои стромы не изменены. Десцеметова мембрана нормальна. Эндотелий интактен (Рис. 8). При сравнении опытных групп и группы контроля процесс заживления происходит намного интенсивнее в опытных группах, что можно объяснить лазерной коагуляцией язвы, позволяющей эффективно санировать очаг воспаления, ускорив тем самым наступление фазы пролиферации. Наиболее оптимальными энергетическими параметрами для эффективной коагуляции язвенного дефекта роговицы, не оказывающими повреждающего воздействия на глубже лежащие структуры (десцеметова мембрана, эндотелий) являются: $P=0,25$ Вт и $t 0,79$ сек. Сравнение результатов в опытных группах I и II позволяет сделать вывод, что после проведения лазерной коагуляции язвы и последующего биостимулирующего лазерного воздействия наблюдается формирование более нежной рубцовой ткани с параллельным ходом волокон, позволяющее предполагать на отдаленном сроке хорошие оптические свойства роговицы и высокие зрительные функции.

Результаты клинических исследований: В клиническую часть исследования вошли 25 пациентов с язвами роговицы.

По результатам бактериологического исследования в 56% всех случаев возбудитель не был выявлен. В 25% случаев высеялся *Staphilococcus epidermidis*, в 12% - *Staphilococcus aureus*, в 4% *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* – 4%, *Enterobacter cloacae* – 4%.

Все пациенты основной группы во время проведения лазерного лечения и после него чувствовали себя удовлетворительно. Общее состояние не изменялось. Оценку эффективности применения лазерного излучения с $\lambda=1.44$ мкм в лечении язв роговицы проводили на основании сроков эпителизации язвенного дефекта роговицы, наличие осложнений, а также интенсивности сформировавшегося помутнения роговицы в исходе заболевания. Сравнительный анализ результатов лечения выявил более высокую эффективность при применении лазерного излучения для лечения язв роговицы (Диаграмма 3). В основной группе эпителизация роговицы начиналась раньше, чем в контрольной. В группе консервативного лечения эпителизация поверхности роговицы наступала на $10,7 \pm 5,28$ сутки. В основной группе А, где проводили лазерную коагуляцию язвенного дефекта, начало эпителизации происходило на $7,0 \pm 2$ сутки, а в подгруппе Б на $6,6 \pm 2,97$ сутки. Как следствие в основной группе в более ранние сроки, чем в контрольной, наступала полная эпителизация язвенного дефекта роговицы: в подгруппе А эпителизация в среднем завершалась к $10,4 \pm 2,3$ суткам, в подгруппе Б к $9 \pm 2,55$ суткам, тогда как в контрольной группе эпителизация завершалась на $16,87 \pm 6,44$ сутки.

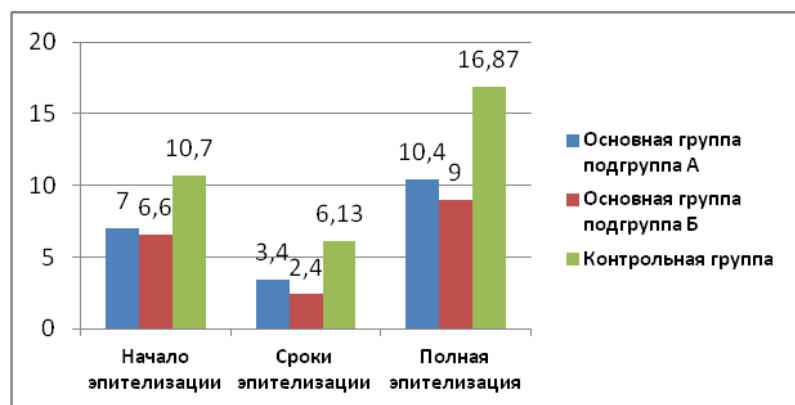


Диаграмма 3. Динамика заживления язвы роговицы в зависимости от метода лечения (средние показатели, дни).

Соответственно при применении лазерного лечения сократился период полной эпителизации и составил в основной группе А $3,4 \pm 0,55$ суток, в подгруппе Б $2,4 \pm 0,54$ суток, тогда как в контрольной группе только $6,13 \pm 1,36$ суток. Таким образом, при применении лазерной коагуляции язвы роговицы в комбинации с консервативным лечением сокращаются сроки полной

эпителизации язвенного дефекта в среднем на 2,73 суток по сравнению с традиционной консервативной терапией, а при последующем биостимулирующем лазерном воздействии - на 3,73 суток по сравнению с группой контроля. В ходе лечения у 2 пациентов контрольной группы отмечено прогрессирование язвенного процесса в глубину роговицы. В первом случае была выполнена покровная пластика аутоконъюнктивой по Кунту. Во втором случае возникла микроперфорация роговицы, блокированная радужкой. Развития осложнений у пациентов основной группы отмечено не было. Формирующееся в исходе язвы роговицы помутнение у пациентов, получавших комплексное лечение с применением лазерной коагуляции и биостимулирующего лазерного воздействия, было значительно меньшей интенсивности, чем у пациентов в группе контроля (Диаграмма 4).

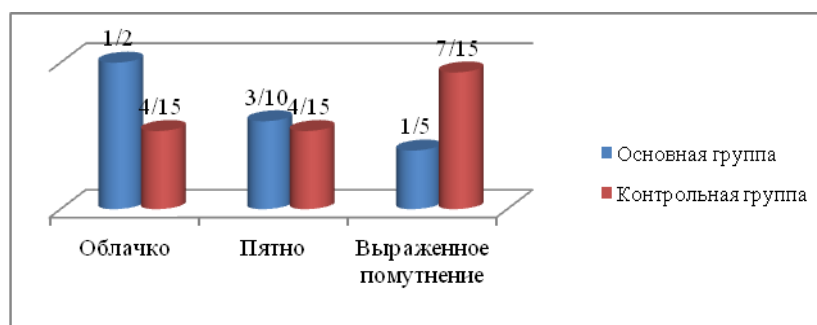


Диаграмма 4. Сформировавшееся помутнение роговицы

Пяти пациентам основной группы было проведено исследование биомеханических свойств роговицы на аппарате Ocular Response Analyzer (ORA, Reichert Inc., США). Во всех случаях у пациентов, перенесших язву роговицы, на соответствующих глазах наблюдалось снижение ФРР, что можно объяснить уплотнением стромы роговицы вследствие процессов заживления и рубцевания (Диаграмма 6).

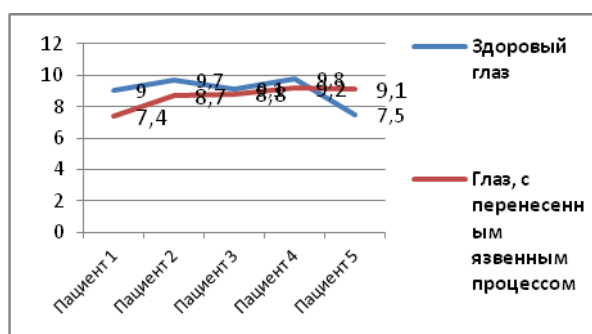


Диаграмма 6. ФРР, мм рт ст.

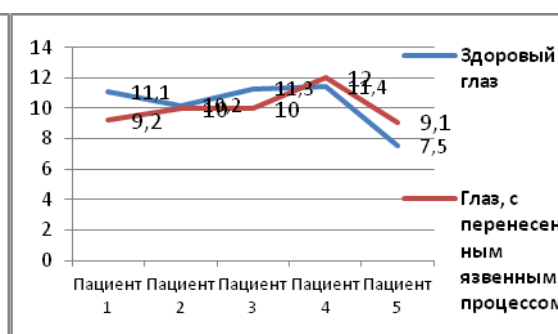


Диаграмма 7. КГ, мм рт ст.

При этом показатель корнеального гистерезиса во всех случаях находился в пределах нормы, хотя и был незначительно снижен по сравнению с парным глазом.

Трем пациентам основной группы, получавшим лазерное лечение, была проведена конфокальная микроскопия роговицы. Исследование выполняли у пациентов с центральной и парацентральной локализацией язв через 3-6 мес. после перенесенного заболевания, когда состояние роговицы уже не препятствовало его выполнению. У данных пациентов в исходе заболевания сформировалось помутнение роговицы в виде облачка. При анализе эпителиального слоя отмечали признаки десквамации поверхностного эпителия (2-3 клетки в поле зрения), изменений базального слоя не выявлено. В поверхностной строме роговицы наблюдали снижение плотности кератоцитов и увеличение плотности экстрацеллюлярного матрикса. Изменений в задних слоях стромы не было. Со стороны эндотелия отмечали полиморфизм и полимегатизм эндотелиальных клеток, при этом плотность эндотелиальных клеток оставалась в пределах нормы.

Таким образом, на основании результатов клинического этапа исследования, можно сделать вывод, что проведение лазерной коагуляции язвы роговицы с последующим биостимулирующим лазерным воздействием в комбинации с консервативной терапией позволяет достоверно снизить средние сроки эпителизации роговицы и риск развития осложнений, способствует формированию более нежного помутнения стромы роговицы по сравнению с традиционным консервативным лечением, безопасен для глубоких слоев роговицы, а также не оказывает негативного влияния на показатель корнеального гистерезиса. Лазерное лечение язвы роговицы, как одноэтапное (лазерная коагуляция язвенного дефекта с saniрующей целью), так и двухэтапное (лазерная коагуляция с последующим биостимулирующим воздействием) с использованием нового диодного лазерного коагулятора ближнего инфракрасного диапазона с длиной волны 1,44 мкм может, наряду с

другими методами, успешно использоваться в комплексном лечении язв роговицы различной этиологии.

Выводы:

1. Впервые в эксперименте *in vitro* изучено влияние лазерного излучения с длиной волны 1.44 мкм на роговицу. При этом морфологический анализ доказывает возможность дозированного лазерного воздействия на роговицу с получением термического эффекта различной степени выраженности: от незначительного нагревания ткани, вызывающего минимальные морфологические изменения, до коагуляционного некроза.
2. Впервые в эксперименте на интактной роговице лабораторных животных (кроликов) в остром и хроническом опыте на основании морфологических исследований и морфометрического анализа доказана возможность использования лазерного излучения на длине волны 1,44 мкм с целью коагуляции и стимуляции пролиферации кератоцитов.
3. В эксперименте *in vivo* на лабораторных животных (кроликов) при лечении экспериментальной бактериальной язвы роговицы установлены повреждающие (мощность свыше 0,25 Вт, экспозиции более 0,8 сек) и лечебные (до 0,25 Вт, до 0,79 сек) энергетические параметры лазерного излучения с $\lambda=1.44$ мкм при воздействии на роговицу. Для коагуляции язвы роговицы оптимальными энергетическими параметрами лазерного излучения с $\lambda=1,44$ мкм являются: мощность 0,25 Вт, длительность импульс 0,79 сек. Для биостимулирующего лазерного воздействия используют лазерное излучение с мощностью 0,15 Вт в импульсном режиме с длительностью импульса 0,11 сек.
4. Применение лазерного излучения с длиной волны 1.44 мкм в лечении экспериментальных язв роговицы позволяет эффективно ее санировать, ускорив наступление фазы пролиферации. При проведении лазерной коагуляции язвы роговицы конъюнктивальная инъекция купируется быстрее на $2,1\pm 0,22$ суток по сравнению с группой контроля, а исчезновение слизистого отделяемого происходит быстрее на $1,62\pm 0,17$ суток. Сроки купирования роговичного синдрома в группе, где на втором этапе проводили

лазерную биостимуляцию низкоинтенсивным лазерным излучением, сокращаются более чем на 2,5 суток по сравнению с группой консервативного лечения. Срок эпителизации роговицы при применении лазерной коагуляции язвы сокращается на $2,75 \pm 0,34$ сутки по сравнению с контрольной группой. При этом еще более эффективно проведение на втором этапе воспалительного процесса биостимулирующего лазерного облучения – сроки эпителизации роговицы сокращаются на $3,75 \pm 0,76$ суток по сравнению с группой контроля. Морфологический анализ экспериментального материала доказывает, что при комбинации лазерной коагуляции язвы и последующего биостимулирующего лазерного воздействия наблюдается формирование более нежной рубцовой ткани с параллельным ходом волокон.

5. Результаты клинических исследований доказывают, что применение лазерной коагуляции, особенно в комбинации с последующим биостимулирующим лазерным воздействием, в комплексном лечении язвы роговицы повышает эффективность лечения: сокращает сроки полной эпителизации роговицы на $2,73 \pm 0,81$ суток при коагуляции язвы и на $3,73 \pm 0,78$ суток при последующем биостимулирующем лазерном облучении по сравнению с консервативной терапией; а также позволяет добиться менее интенсивного помутнения роговицы: в группе лазерного лечения в $\frac{1}{2}$ случаев сформировалось помутнение в виде «облачка», тогда как в группе консервативного лечения в более половины случаев (7 из 15) сформировалось интенсивное помутнение роговицы.

6. Высокая степень поглощения тканью роговицы лазерного излучения на длине волны 1,44 мкм исключает возможность дистантных повреждений глубжележащих тканей глаза.

Практические рекомендации

1. Для практического здравоохранения предложен комбинированный метод лечения язвы роговицы с использованием лазерного излучения ближнего инфракрасного диапазона с длиной волны 1,44 мкм. Лазерное излучение с

$\lambda=1,44$ мкм может использоваться как для коагуляции изъязвленной поверхности роговицы, так и для стимуляции процессов регенерации.

2. Лазерная коагуляция рекомендована при отсутствии положительной динамики на фоне консервативного лечения язвы роговицы. Наиболее оптимальными энергетическими параметрами для проведения лазерной коагуляции изъязвленной поверхности роговицы являются мощность излучения 0,25 Вт, длительность импульса 0,79 сек. Лазерную коагуляцию проводят по всей площади язвенного дефекта.

3. Лазерную коагуляцию рекомендуется применять в комбинации с последующим биостимулирующим лазерным воздействием, что приводит к ускорению процессов регенерации и формированию более прозрачного и нежного рубца. Для биостимулирующего лазерного воздействия рекомендуемыми энергетическими параметрами являются мощность 0,15 Вт, длительность импульса 0,11 сек. Процедуры проводятся ежедневно в течение 3 – 5 дней. Применение биостимулирующего воздействия возможно с момента очищения раны от гнойного отделяемого.

4. Противопоказания к лечению с использованием лазерного излучения на длине волны 1,44 мкм являются злокачественные новообразования органа зрения, острый инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения, острые психические расстройства.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Фролов М.А., Гончар П.А., Казакова К.А., Михайлов В.А., Федоров А.А., Фролов А.М., Калачев Ю.Л., Щербаков И.А. Морфологические особенности воздействия излучения экспериментального лазерного коагулятора ближнего инфракрасного диапазона на роговицу *in vitro* // **Вестник офтальмологии.** – 2012. – № 6. – С. 41-44.
2. Казакова К.А., Фролов М.А., Федоров А.А., Михайлов В.А. Изучение воздействия нового лазерного коагулятора ближнего инфракрасного диапазона на роговицу: экспериментальное исследование // **Врач-аспирант.** – 2014. – Т. 62. – № 1.1. – С.178-185.
3. Казакова К.А., Фролов М.А., Федоров А.А., Михайлов В.А., Гончар П.А., Фролов А.М., Калачев Ю.Л., Щербаков И.А. Применение нового лазерного коагулятора ближнего инфракрасного диапазона для лечения язвы роговицы в эксперименте // **Врач-аспирант.** – 2014. – Т. 64. № 3. – С. 22 -29.

4. Казакова К.А., Фролов М.А., Гончар П.А., Михайлов В.А., Морозова Н.С. Изучение влияния диодного лазерного коагулятора с длиной волны 1.44 мкм на биологическую ткань // Клинические и теоретические аспекты современной медицины: III Международная студенческая научно-практическая конференция с участием молодых ученых: материалы конференции. – М.: РУДН, 2011. – С. 42.
5. Казакова К.А., Фролов М.А., Гончар П.А., Фролов А.М. Воздействие экспериментального лазерного коагулятора ближнего инфракрасного диапазона на роговицу: исследование *in vitro*. // Материалы VII Всероссийской научной конференции молодых ученых с участием иностранных специалистов "Актуальные проблемы офтальмологии": сборник научных работ. – М., 2012. – С. 96-97.
6. Фролов М.А., Гончар П.А., Казакова К.А., Барашков В.И., Фролов А.М. Влияние лазерного излучения ближнего инфракрасного диапазона на роговицу *in vitro* // Здоровье и образование в XXI веке. – 2012. – Т. 14. – № 4. – С.454-455.
7. Казакова К.А., Фролов М.А., Гончар П.А., Фролов А.М. Воздействие экспериментального лазерного коагулятора ближнего инфракрасного диапазона на роговицу: исследование *in vivo* // VIII Всероссийская научная конференция молодых ученых «Актуальные проблемы офтальмологии»: сб. науч. работ. – М., 2013. – С.104-107.
8. Фролов М.А., Казакова К.А., Гончар П.А., Фролов А.М. Воздействие лазерного коагулятора ближнего инфракрасного диапазона на роговицу. Экспериментальное исследование. // Научно-практическая конференция по офтальмохирургии с международным участием «Восток-Запад»: сборник науч. трудов. – Уфа, 2013. – С.112- 113.
9. Фролов М.А., Казакова К.А., Федоров А.А., Михайлов В.А. Морфологические особенности воздействия излучения лазерного коагулятора 1.44 мкм на роговицу: экспериментальное исследование // Sworld: сборник научных трудов. – Одесса, 2013. – Т.47. № 3. – С.71-78.
10. Казакова К.А., Фролов М.А., Гончар П.А., Фролов А.М. Морфологический анализ воздействия излучения лазерного коагулятора 1,44 мкм на роговицу в эксперименте. // Здоровье и образование в XXI веке. – 2014. – № 2 (16). – С. 34-38.
11. Казакова К.А., М.А. Фролов, П.А. Гончар, А.М. Фролов. Применение диодного лазерного коагулятора 1,44 мкм для лечения язвы роговицы // VI Российский общенациональный офтальмологический форум: сб. науч. работ. Т.2. – М., 2014. – С.491-495.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ИК - инфракрасный
- ВГД - внутриглазное давление
- λ - длина волны
- P – мощность излучения
- t – длительность импульса излучения
- E – энергия излучения
- ФРР - фактор резистентности роговицы
- КГ - корнеальный гистерезис
- ЦТР - центральная толщина роговицы