

На правах рукописи

Кузнецов Алексей Витальевич

**ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ
МЕТОДИКИ ПЕРЕКРЕСТНОЙ СШИВКИ КОЛЛАГЕНА РОГОВИЦЫ
(КЛИНИКО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ).**

14.01.07 - глазные болезни

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2014

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт глазных болезней» Российской академии медицинских наук

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук

Бубнова Ирина Алексеевна

Официальные оппоненты:

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

Рыбакова Елена Геннадьевна, доктор медицинских наук, профессор, ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, профессор кафедры офтальмологии имени академика А.П.Нестерова лечебного факультета

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Межотраслевой научно-технический комплекс "Микрохирургия глаза" имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ

Защита состоится «17» ноября 2014 г. в 14.00 на заседании диссертационного совета Д 001.040.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт глазных болезней» Российской академии медицинских наук по адресу: 119021, Москва, ул. Россолимо, д. 11 А, Б.

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

Автореферат разослан «_____» _____ 2014 г

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Иванов М.Н

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования Эктазии роговицы могут быть как проявлением заболевания, так и развиваться как осложнение оперативного вмешательства. Значимость проблемы лечения эктатических заболеваний роговицы в настоящее время возросла, так как наблюдается тенденция к увеличению этого вида глазной патологии. Возможно это связано как с улучшением диагностического оборудования, так и с увеличением количества рефракционных операций, ухудшением экологической обстановки в целом, повышением радиационного фона в отдельных регионах и алергизацией населения.

На сегодняшний день не существует единой точки зрения в отношении лечения эктатических состояний роговицы. С каждым годом появляются новые подходы к тактике ведения данной группы пациентов, которые предполагают использование контактных линз, применение различных хирургических методик (имплантация интрастромальных роговичных сегментов, послойная или сквозная пересадка роговицы) (Мамиконян В.Р. 2011, Калинин Ю.Ю. 2008, Tan B.U. 2006, Miranda D. 2003).

В последние годы, в процессе инновационных разработок в области биофизики, биохимии и медицины, появился новый метод лечения эктатических заболеваний роговицы, в основе которого лежит фотодинамический эффект, приводящий к «перекрестной сшивке» - кросс-линкингу (cross-linking) коллагена и «уплотнению» или увеличению прочности роговицы.

Основоположниками техники «кросс-линкинг» для лечения кератоконуса были Wollensak G, Spoerl E и Seiler в 1990 году. В отличие от хирургических подходов, метод не требует дорогостоящих лазерных установок и прост в исполнении.

Для фотодинамического поперечного сшивания коллагена, в качестве фотосенсибилизатора, было предложено использовать рибофлавин (витамин В2), активирование которого происходит с помощью ультрафиолетового

излучения в диапазоне длин волн спектра А. Выбор был обусловлен нетоксичностью рибофлавина для роговичной ткани, доступностью препарата и сохранением прозрачности при нанесении на роговицу. Однако, для формирования «сшивок» необходимо достаточно длительное излучение в УФ диапазоне, которое не безразлично для состояния эндотелия.

Метод «кросс-линкинга» предполагает возникновение продуктов фотодинамической реакции во всем объеме той области роговицы, которая подвергается экспозиции возбуждающим излучением. Инстилляции рибофлавина, в классическом варианте процедуры, служат не только для фотохимического обеспечения реакции перекрестного сшивания коллагена, но и для создания своеобразного барьера, ограничивающего травмирующее воздействие на задний эпителий роговицы. При прохождении УФ излучения через толщину стромы, по мере расходования квантов на фотодинамическую реакцию и на переизлучение рибофлавином, плотность возбуждающего излучения уменьшается. Правильный подбор спектральных характеристик и мощности облучателя и концентрации рибофлавина позволяет избежать фототоксического поражения ЗЭР. При этом некоторыми авторами (Goldich Y., Terai N.) отмечается недостаточная эффективность процедуры. При её теоретической обоснованности (Rabinowitz Y.S.), клинический эффект не всегда достаточно хорошо выражен.

Очевидно, что если бы фотодинамическая реакция проходила не равномерно во всем объеме роговицы, а избирательно, в непосредственном окружении каждой молекулы структурного белка, то удалось бы избежать травмирующего воздействия при более высокой плотности возбуждающего излучения.

Поэтому необходимо детальное изучение структурных изменений роговицы, параметров проведения процедуры, а так же поиск способов уменьшения воздействия УФ излучения и «протекции» эндотелия. Так же интересен и поиск новых фотосенсибилизаторов способных формировать «сшивки» коллагена различной степени выраженности.

Таким образом, остается актуальным вопрос появления новых фотосенсибилизаторов, изучение возможного влияния процедуры «кросс-линкинг» на различные структуры глаза и изменения физических свойств роговицы после её проведения.

Целью настоящей работы было провести клиническую оценку традиционной методики «кросс-линкинг» при кератоконусе и экспериментально апробировать возможность применения другого фотосенсибилизатора.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить эффективность применения процедуры «кросс-линкинг», проводимой согласно стандартному протоколу, у пациентов с прогрессирующим кератоконусом.
2. Определить и теоретически обосновать возможность применения нового фотосенсибилизатора для проведения процедуры «кросс-линкинг».
3. Изучить в эксперименте морфологическую картину изменения роговицы после проведения процедуры «кросс-линкинг» с различными фотосенсибилизаторами.
4. Выявить прижизненные изменения роговицы при помощи конфокальной микроскопии при применении различных фотосенсибилизаторов у экспериментальных животных.
5. Определить оптическую плотность роговицы экспериментального животного после проведения процедуры «кросс-линкинг» с различными фотосенсибилизаторами.
6. Исследовать изменения биомеханических свойств глаза после проведения процедуры «кросс-линкинг» с различными фотосенсибилизаторами в эксперименте.

Научная новизна

Впервые теоретически обоснована и показана в эксперименте возможность использования фотосенсибилизатора фталоцианинового ряда как субстрата для проведения процедуры «кросс-линкинг» роговицы.

Впервые в эксперименте на основе данных денситометрии, конфокальной микроскопии, морфологических и биомеханических исследований изучено состояние роговицы после проведения процедуры «кросс-линкинг» с использованием фотосенсибилизатора фталоцианинового ряда.

Практическая значимость

Теоретически обоснована и экспериментально апробирована возможность проведения процедуры «кросс-линкинга» с препаратом фталоцианинового ряда «Фотосенс» для лечения эктатических заболеваний глаз.

Доказана эффективность фотодинамического воздействия с препаратами на основе рибофлавина и фталоцианинов на коллаген роговицы в эксперименте.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в проведении всех экспериментальных и клинических исследований, апробации результатов, подготовке публикаций и докладов по теме диссертации. Вся обработка и интерпретация полученных результатов выполнена лично автором.

Основные положения, выносимые на защиту

Фотосенсибилизатор фталоцианинового ряда «Фотосенс» может быть использован для проведения процедуры «кросс-линкинг» в эксперименте.

Использование в качестве фотосенсибилизатора препаратов из группы фталоцианинов, приводит к снижению плотности кератоцитов в

верхних и средних слоях стромы при исследовании через 1 неделю после процедуры, и как следствие к реактивному повышению пролиферативной активности кератоцитов и более компактному расположению стромальных пластин – через 1 месяц.

Апробация результатов работы

Результаты работы доложены и обсуждены на IX съезде офтальмологов России (Москва, 2010); на научно-практических конференциях «Роль и место фармакотерапии в современной офтальмологической практике» (Санкт-Петербург, 2009); «Актуальные проблемы офтальмологии» (МНТК имени Фёдорова, Москва, 2009); «7th International symposium. Photodynamic therapy and photo diagnosis in clinical practice» (Italy, Brixen, 2008); «13th Congress of the European society for photobiology conjunction with the 2nd Conference of the European Platform for Photodynamic Medicine» (Poland, Wroclaw, 2009); «12th World Congress of the International Photodynamic Association» (USA, Seattle, 2009); «The International Symposium on Ocular Pharmacology and Therapeutics» (Austria, Vienna, 2011).

Внедрение результатов исследования

Полученные результаты исследования внедрены и применяются в работе ФГБУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней» РАМН.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, из них 3 – в журналах, входящих в перечень рецензируемых журналов и изданий, определённых ВАК. Получен 1 патент РФ на изобретение: «Способ лечения кератоконуса» №2388436 от 10.05.2010.

Объем и структура диссертации.

Диссертация содержит 144 страницы и состоит из введения, 7 глав, заключения, выводов, списка литературы, включающего 52 отечественных и 107 иностранных источников. Диссертация иллюстрирована 8 таблицами и 55 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

В основу работы положены результаты экспериментальных исследований, проведенных на базе Научно-исследовательского института глазных болезней Российской академии медицинских наук и кафедры глазных болезней Первого МГМУ им. И. М. Сеченова с 2010 года по 2014 годы.

Работа состоит из двух частей: клинической и экспериментальной.

Характеристика клинического материала работы

Всего было обследовано 33 пациента (66 глаз) с кератоконусом I – III стадии в возрасте от 23 до 34 лет.

Распределение пациентов по степени развития кератоконуса проводили согласно классификации Amsler:

- ✓ I стадия – 17 глаз;
- ✓ II стадия – 23 глаз;
- ✓ III стадия – 26 глаз;

Критерии включения пациентов:

- отсутствие данных о хирургических вмешательствах на роговице;
- отсутствие сопутствующей глазной патологии.

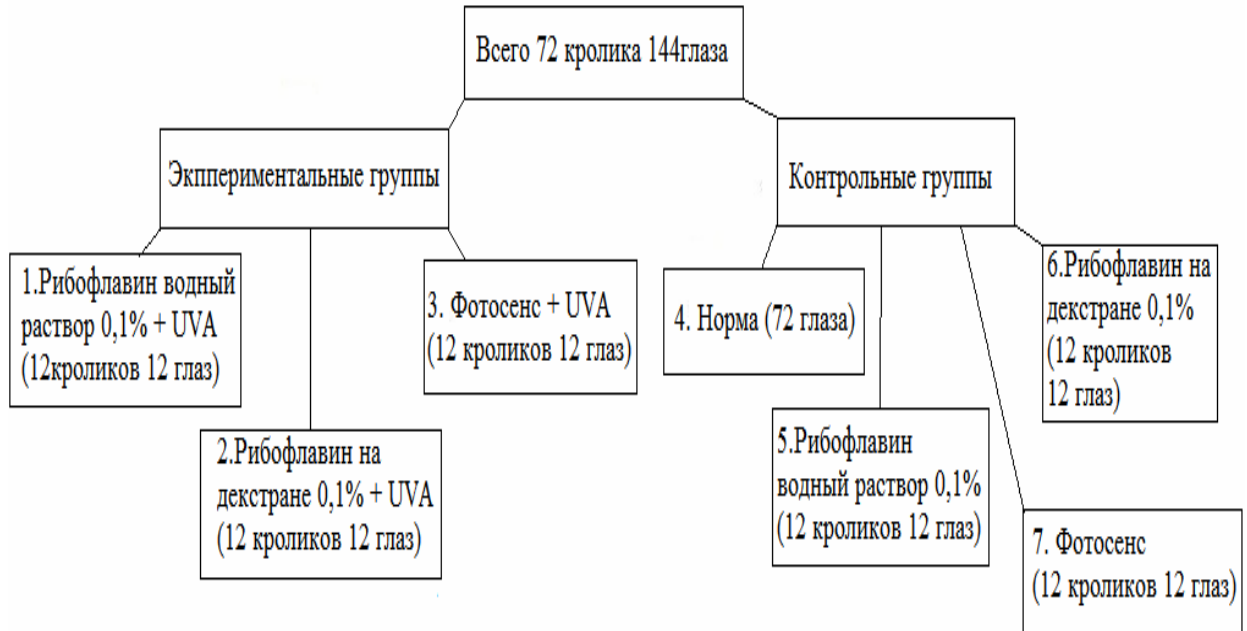
Рефракция роговицы в центральной зоне у пациентов показатель офтальмометрии в среднем составил $47,67 \pm 2,38$ дптр, с разбросом значений от 44,9 до 50,2 дптр. Кривизна роговицы на вершине кератоконуса была от 47,1 до 53,6 дптр., толщина роговицы в центре в среднем была $487 \pm 35,6$ мкм. На кератотопограмме имел место типичный паттерн усиления рефракции роговицы в нижней части. У всех пациентов на момент проведения процедуры регистрировали прогрессирующее течение заболевания на обоих глазах.

Всем пациентам на худшем глазу была выполнена процедура «кросс-линкинг» по стандартному протоколу. Второй глаз являлся контрольным. Сроки наблюдения составляли 1, 6, 12 и 24 месяца после вмешательства.

Характеристика экспериментального материала работы

Работа была выполнена на кроликах породы Шиншилла (самцы, массой 2-3 кг, 144 глаза)

Схема эксперимента.



В соответствии с поставленными задачами все животные были разделены на 7 групп: 3 экспериментальных и 4 контрольных (Рисунок 1). Кроликам 1-3 групп осуществляли деэпителизацию роговицы, после чего закапывали в течение 15 минут соответствующий фотосенсибилизатор и проводили облучение ультрафиолетовым светом (длина волны 365 нм) на расстоянии 5 см и плотностью мощности (3 мВт/см²) в течение 30 минут. В первой группе в качестве фотосенсибилизатора применяли 0,1% водный раствор рибофлавина, во 2 группе – 0,1% раствор рибофлавина на декстране, в 3 - использовали препарат «Фотосенс» (0,2% раствор в общем объеме 2 мл производства ФГУП «ГНЦ НИОПИК»), разрешенный для медицинского применения при проведении ФДТ и ФД злокачественных онкологических заболеваний. Регистрационное удостоверение Р № 000199/02–2001 от 25.07.2001). В контрольных группах 5-7 после

деэпитализации проводили закапывание соответствующего ФС без последующего облучения. В 4 группе – все глаза являлись парными (интактными) и были приняты за норму.

Офтальмологические методы обследования.

В ходе проведения клинической работы обследование пациентов проводили с помощью общепринятых (стандартных) офтальмологических методик: визометрии без коррекции и со сфероцилиндрической коррекцией, рефрактометрии, офтальмометрии, статической периметрии, пневмотонометрии, компьютерной кератотопографии, УЗ-пахиметрии, биомикроскопии переднего отрезка глаза и офтальмоскопии.

В рамках экспериментальной части для оценки состояния переднего отдела глаза использовали метод фокального бокового освещения. Биомикроскопические исследования проводили с помощью щелевой лампы по методике Шульпиной Н.Б.

Специальные методы исследования

Помимо этого применяли специальные офтальмологические методы:

1. Конфокальная биомикроскопия;
2. Исследование оптической плотности роговицы;
3. Исследование биомеханических свойств роговицы.
4. Эластотонометрия

Конфокальную микроскопию с использованием конфокального микроскопа «Confoscan - 4» (Nidek, Japan) при увеличении x500 проводили до, через 1 неделю и через 1 месяц после проведения облучения.

Оптическую плотность роговицы определяли по данным денситометрии роговицы, полученным с помощью сканирующей системы переднего отрезка глаза Pentacam (Oculus, Германия), который основан на принципе Шаймпфлюг камеры. Исследование проводили *in vivo* через 1 неделю и через 1 месяц после проведения процедуры «кросс-линкинг», так

как необходимым условием для выполнения этих манипуляций являлась полная эпителизация роговицы.

Исследование биомеханических свойств роговицы *in vivo* проводили с помощью анализатора биомеханических свойств роговицы (OcularResponseAnalyzer - ORA), который основан на принципе пневмотонометрии с динамической двунаправленной аппланацией роговицы. При этом анализировали два показателя - корнеальный гистерезис (КГ – corneal hysteresis), который отражает вязко-эластичные свойства роговой оболочки, и фактор резистентности роговицы (ФРР) (corneal resistance factor), который характеризует общую ригидность роговицы. Исследование проводили прижизненно через 1 месяц после процедуры.

Всем пациентам проводили эластотонометрию по упрощенной методике с помощью тонометров Маклакова массой 5, 10 и 15 г. В качестве критерия оценки результатов использовали величину эластоподъема (разницу между показателями внутриглазного давления, измеренного тонометрами Маклакова массой 5 и 15 г). При значении эластоподъема более 11 мм рт. ст. определяли упругие свойства роговицы как сниженные, при значении от 9 до 11 мм рт. ст. – как нормальные, при значении менее 9 мм рт. ст. – как повышенные.

Гистологические методы исследований

Энуклеацию глаз проводили через 1 неделю и 1 месяц после эксперимента. Энуклеированные глаза подвергались обязательному патогистологическому исследованию. Полученный материал фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезвоживали в спиртах и заливали в парафин и готовили срезы (толщиной 5-8 мкм). Депарафинированные срезы окрашивали гематоксилин-эозином и по Ван Гизону. Для получения полутонких срезов, интересующие нас образцы тканей глаза, размерами 2x2 мм помещали в холодный фиксирующий 2,5% раствор глутаральдегида на 0,1 М фосфатном буфере (pH=7,4). Через 2 часа отмытые в буфере образцы дофиксировались в 1% растворе осмиевой кислоты. После обезвоживания в

батареи спиртов возрастающей концентрации препараты заключали в смесь эпоксидных смол (эпон- альдегид). Полутонкие срезы (толщиной 0,5-1 мкм) готовили на Ультратоме Нова (ЛКВ, Швеция) и окрашивали толудиновым синим, а также полихромным методом (метиленовый синий и фуксин). Окрашенные препараты исследовали на световом «Фотомикроскопе III» (Opton, Германия), совмещенным с аппаратно-программным комплексом автоматической морфоденситометрии «ДиаМорф Объектив», компании «ДиаМорф». Фоторегистрация осуществлялась на цифровую фотовидеокамеру «ДиаМорф» в составе комплекта.

Трансмиссионная электронная микроскопия.

Для проведения трансмиссионной электронной микроскопии, глаза энуклеировали через 1 неделю и 1 месяц после эксперимента. Из зоны воздействия вырезали фрагменты роговицы размером 1,5x1,5 мм, фиксировали в течение суток в 1,5% растворе глутаральдегида на какодилат-натриевом буфере (pH=7.4) при $t = 4^{\circ}\text{C}$ с последующей дофиксацией в 1% растворе осмиевой кислоты (OsO_4). Далее образцы обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и пропиленоксиде, заливали в полимерную смолу Эпон 812 (SPIsupplier, США). Из полимеризованных блоков изготавливали полутонкие срезы (толщиной 1-1,5 мкм) на ультратоме Nova (ЛКВ, Швеция), которые окрашивали полихромным красителем (метиленовый синий, азур II и основной фуксин). Готовые препараты исследовали на «Фотомикроскопе III» (Opton, Германия). Фоторегистрацию на цифровую фотовидеокамеру и морфометрический анализ изображений проводили с помощью программного обеспечения фирмы «Мекос». Под контролем оптического микроскопа затачивали пирамиду в интересующей области для получения ультратонких срезов (серебристо-серого цвета). Далее осуществляли ручное контрастирование спиртовым раствором уранил-ацетата и солями свинца (по методике Рейнольдса). Ультраструктурное исследование проводили на трансмиссионном электронном микроскопе EM-10C (Opton, Германия) при ускоряющем напряжении 60 kV.

Фотографирование изображений осуществляли на фотопластины Kodakelectron, США. Для перевода изображения в цифровой формат использовали сканер.

Условия проведения процедуры формирования «сшивок» коллагена роговицы.

Для проведения процедуры формирования «сшивок» коллагена роговицы использовали прибор «UV-X версия 1000» (авторские права принадлежат компании IROCAG, Швейцария, август 2006г.). Прибор UV-X, представляет собой персональный медицинский оптикоэлектронный прибор, систему источника УФ – излучения для медицинской терапии (фотодинамической терапии) класса Па, и соответствует существующим требованиям положений 93/42/ЕЕС приложение IV. Излучающие УФ диоды («LED») прибора создают UV-A излучение с длиной волны 365 нм. Прибор используется для воздействия УФ-излучения на роговицу глаза во время процедур крослинкинга. UV-X прибор обеспечивает постоянную дозу UV-A излучения для целевой области воздействия.

Апертура пучка УФ-излучения имеет диаметр примерно 25мм. Плоскость воздействия расположена на расстоянии примерно 50мм от апертуры пучка. Диаметр в плоскости воздействия можно выбирать с помощью колёсика апертуры. Доступны три размера диаметра: S – малый, диаметр приблизительно 7,5 мм; M – средний, диаметр приблизительно 9,5 мм; L – большой, диаметр приблизительно 11,5 мм.

Схема проведения ФДТ.

Условия облучения: сеанс проводится сразу после насыщения роговицы соответствующим фотосенсебилизатором. Облучение происходит ультрафиолетовым светом (длина волны 376-375 нм) на расстоянии 5см и плотностью мощности (3мВт/см²). Длительность облучения составляет 30 минут.

Деэпителизация роговицы: производится под местной инстилляционной анестезией в центральной зоне диаметром 8-11 мм.

Контроль: Измерение УФ – излучения проводится перед каждым сеансом облучения по средствам специально адаптированного датчика идущего в комплекте с прибором «UV-X версия 1000».

В качестве фотосенсибилизаторов использовали:

1. Водный раствор рибофлавина 0,1%.

Активное вещество препарата РИБОФЛАВИН-МОНОНУКЛЕОТИД – в офтальмологии применяется при чашеобразных катарактах, применяют 1 % раствор рибофлавин-моноклеотида для инстилляций в конъюнктивальный мешок. Регистрационные данные о лекарственном препарате: Р №003933/01, р-р. для внутримышечного введения 1% (10 мг/1 мл): амп. 10 шт. Производитель: «НОВОСИБХИМФАРМ, ОАО».

2. Раствор рибофлавина 0,1% в растворе декстрана 20,0%

Протектор роговицы «Декстралинк» – предназначен для использования в офтальмологии при проведении процедуры УФ-кросслинкинга в условиях лечебных, лечебно-профилактических и научно-исследовательских медицинских учреждений (патент № 2412707), регистрационное удостоверение № ФСР 2010/09071.

Теоретическое обоснование применения препарата фталоцианинового ряда «Фотосенс» в качестве фотосенсибилизатора при проведении процедуры «кросс-линкинг».

В основе предлагаемого метода — способность структурных белков к каскадной люминесценции. Если возбуждать белковую молекулу излучением с фиксированной длиной волны, то при переизлучении, молекула белка будет испускать непрерывный спектр в более длинноволновом диапазоне, по отношению к возбуждающему излучению. Таким образом, при насыщении основного вещества роговицы фотосенсибилизирующим веществом с собственной люминесценцией (λ_3), для которого эффективным было бы возбуждение длиной волны (λ_2), можно добиться того, чтоб источником этого излучения стали сами молекулы структурных белков. Для этого всю роговицу необходимо экспонировать более коротковолновым излучением

($\lambda_1 < \lambda_2 < \lambda_3$), тогда в непрерывном спектре, переизлучаемом белковыми молекулами (конечными мишенями ФДТ), будет, и в том числе длина волны, необходимая для фотосенсибилизации.

Для того, что бы убедиться в достаточности квантового выхода флуоресценции структурных белков для вторичной индукции, а также для формирования представления о микроструктурной позиции люминесцирующих зон в роговице, был проведен ряд экспериментов. Были получены люминесцентные изображения препарата роговицы человека, подготовленного методом криосублимации «в обход критической точки». Кроме того была проведена спектроскопия. Люминесценция изучалась на конфокальном металлографическом микроскопе ПОЛАМ Р-312, оборудованном лазерной люминесцентной приставкой и спектрометром OCEANOPTICNIR-VIS (США).

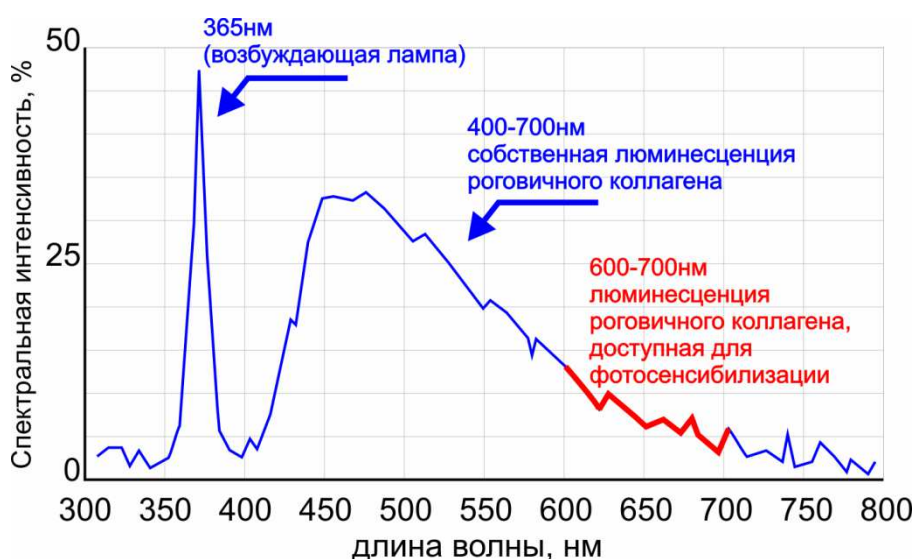


Рис 1. Спектр люминесценции коллагена роговицы при возбуждении длиной волны, используемой в установке «UV-X версия 1000». Красным выделен спектральный диапазон люминесценции, способный возбуждать фотодинамическую реакцию «фотосенса». Источник возбуждающего излучения подавлен при спектрометрии ($I=0,3$) дихроичным фильтром 350-400нм.

Результаты экспериментов показали возможность дальнейшего использования предлагаемой методики повышения селективности ФДТ роговицы.

В этом случае, теоретическая интенсивность фотодинамического воздействия будет максимальной в непосредственной близости от молекулы белка, т. к. сама молекула-мишень будет являться источником возбуждающего излучения (рис. 1).

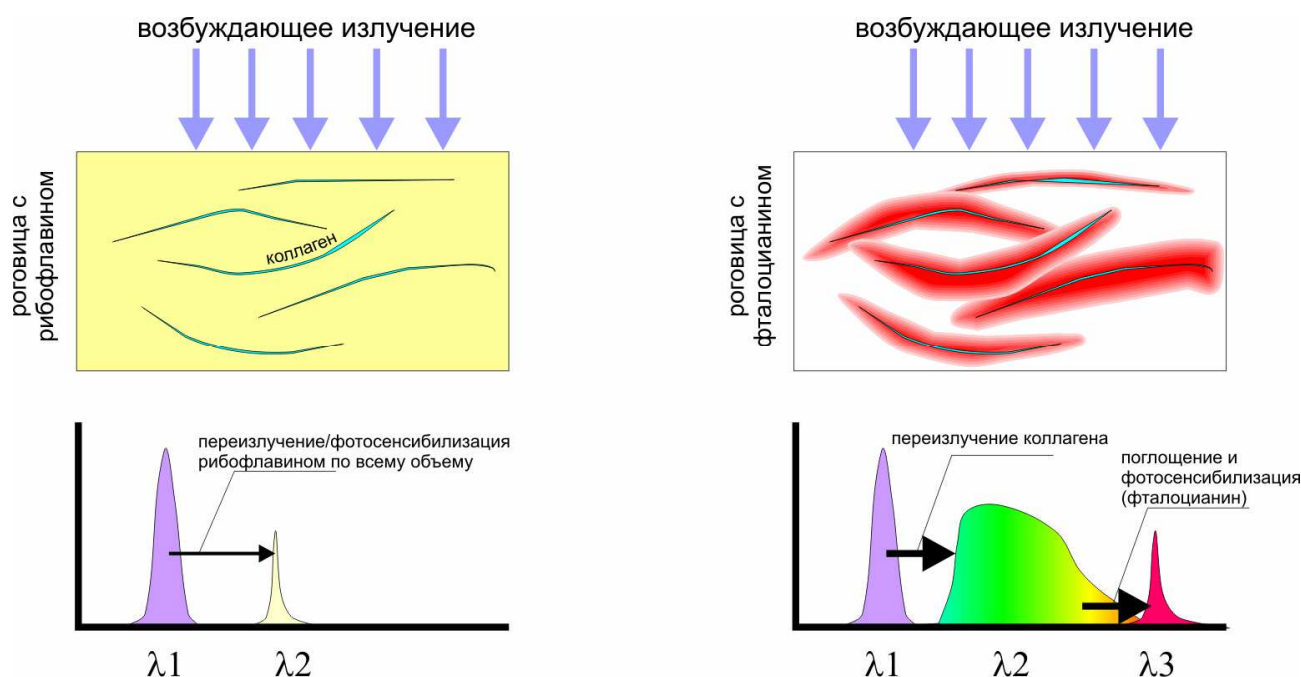


Рис 2. Принцип избирательности фотодинамического воздействия на collagen стромы в классической схеме «перекрестного сшивания» (а) и при использовании селективной фотосенсибилизации (б).

Предлагаемая схема может допускать использование более агрессивных фотосенсибилизаторов, т. к. их фототоксическое воздействие будет локализовано на молекулярном уровне. Необходимо только соблюдение условия достаточного спектрального отстояния линии (λ_1) первичного возбуждающего излучения (лампа-излучатель) от максимума эффективности возбуждения фотосенсибилизации (λ_2).

В экспериментальной модели, было предложено использовать комбинацию фотосенсибилизатора на основе фталоцианина алюминия «Фотосенс», с фотодинамической эффективностью при возбуждении в длинноволновой части видимого спектра ($\lambda_2=635\text{nm}$) и коротковолновый источник первичного излучения, применяемый при «кросс-линкинге» ($\lambda_1=635\text{nm}$). Препарат «Фотосенс» разработан ФГУП «ГНУ НИОПИК», разрешённый для медицинского применения при проведении ФДТ и ФД злокачественных онкологических заболеваний. Регистрационное удостоверение Р №000199/02 – 2001 от 25.07.2001.

Результаты собственных исследований.

Клиническое исследование эффективности процедуры «кросс-линкинг» у пациентов с прогрессирующим кератоконусом.

При проведении клинического исследования пациентов в сроки через 1, 6, 12 и 24 месяца после процедуры «кросс-линкинг» в 97 % случаев по данным визометрии, офтальмометрии, кератотопографии и пахиметрии была выявлена стабилизация процесса и незначительное улучшение зрения. Тогда как в 3 % случаев через 2 года наблюдения было отмечено прогрессирование кератоконуса, однако в меньшей степени, чем на парном глазу.

Показатели, отражающие биомеханические свойства, такие как корнеальный гистерезис, фактор резистентности роговицы и эластоподъем статистически достоверно не отличались во все сроки наблюдения.

Экспериментальные исследования процедуры «кросс-линкинг» с различными фотосенсибилизаторами на роговицах кролика.

При проведении конфокальной микроскопии было выявлено, что через 24 часа после проведения процедуры «кросс-линкинг» в основных и контрольных группах присутствовал отек, резкое увеличение общей рефлективности, ступенчатость границ ядер кератоцитов, вакуолизация цитоплазмы.

Через 1 неделю в контрольных группах изменений не было. В основных группах наблюдали остаточный отек в эпителии и строме, а также

появление исчерченности в экстрацеллюлярном матриксе. Эндотелий был не изменен.

При проведении конфокальной микроскопии через 1 месяц в 1 и 2 группах отмечали значительную исчерченность передней стромы роговицы, тогда как в 3 группе исчерченность была менее выражена. При этом регистрировали большую гиперрефлективность, что может свидетельствовать об активной пролиферации кератоцитов.

Задняя строма и эндотелий в основных группах через 1 месяц после проведения процедуры «кросс-линкинг» были не изменены.

При гистологическом исследовании в основных группах через 24 часа после проведения процедуры «кросс-линкинг» наблюдали межпластинчатый отек стромы, особенно в случае применения водного раствора рибофлавина и препарата «Фотосенс» (1 и 3 группа). Помимо этого в строме практически отсутствовали кератоциты, а малочисленные сохранившиеся были в атрофированном состоянии.

Через 1 неделю в 1 и 2 группах отмечали уменьшение плотности кератоцитов в поверхностных слоях и относительное снижение в средних слоях стромы, тогда как в 3 группе было выявлено минимальное повышение плотности кератоцитов. Смежные коллагеновые пласты, расположенные близко друг к другу, образовали единый конгломерат с одновременным сохранением параллельного хода волокон. В задней строме роговицы плотность кератоцитов была в пределах нормы.

Через 1 месяц в 1 и 2 группе субэпителиально располагались пролиферирующие (активированные) кератоциты с гиперхромными ядрами. Вследствие этого средняя плотность кератоцитов в передних слоях стромы была относительно повышена. В 3 группе по сравнению с первыми двумя, строма роговицы отличалась выраженной гиперцеллюлярностью с некоторым преобладанием плотности кератоцитов в поверхностной строме. Задний эпителий сохранял свое обычное строение и плотность. Смежные коллагеновые пластины при этом оставались плотно прилежащими друг к

другу, что придавало строге более компактную архитектонику. Кроме того, в поверхностной строге отмечали пролиферативную активность кератоцитов, наличие поперечной исчерченности и более компактное расположение стромальных пластин. Отмеченная фиброплазия в поверхностной строге способствует механическому укреплению каркасных структур роговицы, что, однако, может привести к временному снижению прозрачности роговицы. Это естественный путь встраивания новых клеточных элементов в сохранившийся коллагеновый матрикс. Поперечно расположенные линейные структуры, возможно, являются утолщением поперечных связей, существующих в норме коллагеновых пластин.

При этом в контрольных группах (4, 5, 6, 7, 8) подобных изменений отмечено не было.

Исследование оптической плотности роговицы через 1 неделю после проведения процедуры «кросс-линкинг» показало статистически значимое увеличение денситометрических показателей в основных группах, где в качестве фотосенсибилизатора применяли водный раствор рибофлавина в среднем до $26,6 \pm 4,9$ % ($p < 0,1$), раствор рибофлавина на декстрате в среднем до $22,9 \pm 4,2$ % ($p < 0,1$), раствор фотосенса до $30,8 \pm 5,1$ % ($p < 0,1$) и раствор фталосенса в среднем до $32,8 \pm 5,3$ % ($p < 0,1$) и снижение этих показателей через 1 месяц после процедуры, однако достижения доопрецизионных значений зарегистрировано не было.

Также в основных группах было выявлено, что наибольшие изменения оптической плотности роговицы наблюдались в передней трети толщины роговицы. Тогда как в 4, 5, 6, 7 группах (контрольных) денситометрические показатели практически не изменились.

В результате исследования биомеханических свойств роговицы, как в основных, так и в контрольных группах не было выявлено статистически значимой разницы между показателями, полученными до и через 1 месяц после проведения процедуры (таб. 1, 2).

Таблица 1.

Показатель корнеального гистерезиса до и через 1 месяц после проведения процедуры «кросс-линкинг», $M \pm \sigma$ мм рт. ст.

	до	через 1 месяц	
1 группа	3,6±0,81	3,7±0,95	$p \geq 0,05$
2 группа	3,5±0,78	3,6±0,74	$p \geq 0,05$
3 группа	3,8±0,99	3,7±0,91	$p \geq 0,05$
5 группа	3,6±0,71	3,5±0,85	$p \geq 0,05$
6 группа	3,7±0,96	3,7±0,79	$p \geq 0,05$
7 группа	3,5±0,77	3,6±0,82	$p \geq 0,05$

Таблица 2.

Показатель фактора резистентности роговицы до и через 1 месяц после проведения процедуры «кросс-линкинг», $M \pm \sigma$ мм рт. ст.

	до	через 1 месяц	
1 группа	3,2±0,78	3,3±0,87	$p \geq 0,05$
2 группа	3,1±0,82	3,2±0,94	$p \geq 0,05$
3 группа	3,3±0,69	3,3±0,72	$p \geq 0,05$
5 группа	3,2±0,70	3,2±0,76	$p \geq 0,05$
6 группа	3,3±0,88	3,4±0,81	$p \geq 0,05$
7 группа	3,4±0,58	3,3±0,80	$p \geq 0,05$

Таким образом, в результате проведенных исследований, как в основных, так и в контрольных группах не было выявлено статистически значимой разницы между показателями, полученными до и через 1 месяц после проведения процедуры. Эти данные согласуются с теми, что получены при изучении изменения биомеханических свойств роговицы у пациентов с кератоконусом, перенесших процедуру «кросс-линкинг».

ВЫВОДЫ

1. Впервые на достаточном клиническом (66 - глаза с прогрессирующим кератоконусом) и экспериментальном (144 глаза кроликов породы Шиншилла, самцы массой 2-3 кг) материале была исследована эффективность процедуры «перекрестной сшивки» коллагена роговицы («кросс-линкинг») с различными фотосенсибилизаторами.

2. Клиническое исследование на основании данных визометрии, офтальмометрии, пахиметрии, кератотопографии, а также анализа биомеханических свойств роговицы в группе пациентов с прогрессирующим кератоконусом выявило стабилизацию процесса после стандартной процедуры «кросс-линкинг» в 97 % случаев, тогда как в 3 % случаев была отмечена отрицательная динамика изменений параметров роговицы через 2 года после вмешательства. Во всех случаях наблюдения на парных глазах было отмечено ухудшение состояния кератоконуса.

3. Впервые теоретически обосновано применение препарата фталоцианинового ряда («Фотосенс») в качестве фотосенсибилизатора для процедуры «кросс-линкинг». В эксперименте изучены изменения структуры роговицы при использовании таких фотосенсибилизаторов как водный раствор рибофлавина, раствор рибофлавина на декстрани и «Фотосенс» (основные группы наблюдения).

4. По данным морфологического исследования показано, что при использовании в качестве фотосенсибилизатора препарата из группы фталоцианинов («Фотосенс») отмечали большее количество кератоцитов в передних и средних слоях стромы по сравнению с группами, где применяли водный раствор рибофлавина или раствор рибофлавина на декстрани через 1 месяц после процедуры. Тогда как отличий в увеличении плотности и компактности коллагеновых волокон по своей морфологической картине в основных исследуемых группах выявлено не было.

5. При конфокальной микроскопии в роговице кролика через 1 месяц после процедуры «кросс-линкинг» обнаружено большое количество «активированных» кератоцитов, находящихся в стадии пролиферации. Увеличение гиперрефлексивности было особенно выраженным в группе, где в качестве фотосенсибилизатора использовали «Фотосенс».

6. Исследование оптической плотности роговицы кролика через 1 неделю после проведения процедуры «кросс-линкинг» показало статистически значимое увеличение денситометрических показателей в основных группах, где в качестве фотосенсибилизатора применяли водный раствор рибофлавина, рибофлавина на декстрани и раствор «Фотосенс» (в среднем до $40,2 \pm 4,5\%$, $37,1 \pm 3,8\%$, $43,2 \pm 4,1\%$ ($p < 0,1$) соответственно) и снижение уровня этих показателей через 1 месяц после процедуры, который при этом оставался выше дооперационных значений.

7. Исследование биомеханических свойств роговицы кролика, как в основных группах, где применяли изучаемые фотосенсибилизаторы по стандартной технологии, так и в контрольных группах не выявило статистически значимой разницы между показателями, полученными до и через 1 месяц после проведения процедуры.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Мамиконян В.Р., Кузнецов А.В., Будзинская М.В., Бубнова И.А., Бородин Н.В., Федоров А.А., Воеводина Т.М. Экспериментальное исследование "перекрёстного сшивания" коллагена роговицы с применением различных фотосенсибилизаторов // Роль и место фармакотерапии в современной офтальмологической практике. Сборник научных трудов конференции. Санкт-Петербург, 2009. 129-131с.
2. Мамиконян В.Р., Кузнецов А.В., Бубнова И.А., Бородин Н.В., Федоров А.А., Воеводина Т.М., Будзинская М.В. Экспериментальное исследование морфологических и биомеханических изменений при проведении

«перекрестного сшивания» коллагена роговицы. // Сборник трудов конференции «Биомеханика глаза». Москва, 2009г. 75–78с.

3. Мамиконян В.Р., Кузнецов А.В., Будзинская М.В., Бубнова И.А., Бородина Н.В., Воеводина Т.М. Экспериментальное исследование "перекрёстного сшивания" коллагена роговицы с применением различных фотосенсибилизаторов //Актуальные проблемы офтальмологии (МНТК имени Фёдорова) Сборник научных трудов конференции. Москва , 2009. 45-47с.

4. Мамиконян В.Р., Кузнецов А.В., Бубнова И.А., Бородина Н.В., Федоров А.А., Воеводина Т.М., Будзинская М.В. Экспериментальное исследование «перекрёстного сшивания» коллагена роговицы. - Бюллетень СО РАМН, Том 138, №4, 2009. 35-36с.

5. Мамиконян В.Р., Кузнецов А.В., Бубнова И.А., Бородина Н.В., Будзинская М.В., Федоров А.А., Воеводина Т.М. Морфологические изменения роговицы кролика после cross-linking. - Саратовский научно-медицинский журнал, Том 6, №1, 2010. 214с.

6. Бубнова И.А., Кузнецов А.В. Экспериментальное исследование возможности применения различных фотосенсебилизаторов для перекрестного «сшивания» коллагена роговицы. // IX съезд офтальмологов России. Сборник научных трудов конференции. Москва , 2010. 303с.

7. Аветисов С.Э., Бубнова И.А., Антонов А.А., Кузнецов А.В. Биомеханические свойства роговицы: клиническое значение, методы исследования, возможности систематизации подходов к изучению. - Вестник офтальмологии, Том 126, №6, 2010. 3-7с.

8. Avetisov S., Mamikonian V., Budzinskaya M., Borodina N., Fedorov A., Kuznecov A., Kuzmin S., Vorozhtsov G. Confocal microscopy rabbit cornea in normal and after Photosens-ultraviolet-A-induced cross-linking //7th International Symposium. Photodynamic Therapy and Photodiagnosis in Clinical Practice (Italy), Brixen, 2008г. 101с.

9. Kuzmin S., Avetisov S., Mamikonian V., Budzinskaya M., Borodina N., Bubnova I., Fedorov A., Kuznecov A. Corneal damage after photosens-ultraviolet - induced cross-linking in the rabbit //12th World Congress of the International Photodynamic Association (IPA) (USA), Paper Seattle, 2009г. 63с.
10. Mamikonian V., Budzinskaya M., Borodina N., Bubnova I., Fedorov A., Kuznecov A., Voevodina T., Kuzmin S., Vorozhtsov G. Keratocyte changes after photosens-ultraviolet-induced cross-linking //13th Congress of the European Society for Photobiology in conjunction with the 2nd Conference of the European Platform for Photodynamic Medicine (EPPM) (Poland), Wroclaw , 2009г. 123с.
11. Avetisov S., Mamikonian V., Kuznetsov A., Bubnova I., Fedorov A., Voevodina T., Budzinskaya M., Kuzmin S., Vorozhtsov G. Experimental Study of Corneal Cross-Linling with Different Drops of Photosensitizers //The International Symposium on Ocular Pharmacology and Therapeutics (Austria), ISOP Clinical Vienna, 2011г. 91с.
12. Аветисов С.Э., Мамиконян В.Р., Бубнова И.А., Будзинская М.В., Бородина Н.В., Ворожцов Г.Н., Кузнецов А.В., Кузьмин С.Г., Федоров А.А. Способ лечения кератоконуса. Патент РФ № 2388436 от 10.05.2010

Список сокращений

UVA - ультрафиолетовый свет А-спектра

ФС - фотосенсибилизатор

УФ - ультрафиолетовый свет

ЖКЛ - жесткие контактные линзы

ФДТ - фотодиамиическая терапия

ВГД - внутриглазное давление

ФРС - фактор резистентности роговицы

КГ - корнеальный гистерезис

Дптр - диоптрий

Мкм - микрометр

Мм - миллиметр

Р-р - раствор