

## ЛАЗЕРНАЯ МЕДИЦИНА

## Воздействие лазерного УФ излучения на склеральную ткань глаза больных открытоугольной глаукомой

А.М.Ражев, И.А.Искаков, Д.С.Чуркин, А.М.Оришнич, Н.А.Маслов, Е.О.Цибульская, А.А.Ломзов, О.В.Ермакова, А.Н.Трунов, В.В.Черных

*Представлены результаты экспериментального исследования воздействия короткоимпульсного лазерного УФ излучения на склеральную ткань глаза. В качестве образцов использовались изолированные лоскуты склеральной ткани глаз больных открытоугольной глаукомой 2-й и 3-й стадий. Воздействие осуществлялось излучениями эксимерного ХеСI-лазера с длиной волны 308 нм и лазера с длиной волны, перестраиваемой в диапазоне 210–355 нм. Плотность энергии на поверхности облучаемой ткани в зависимости от задачи варьировалась от долей мДж/см<sup>2</sup> до 15 Дж/см<sup>2</sup>. Впервые исследованы оптические свойства внутриглазной жидкости в УФ и синей областях спектра. Исследования процесса абляции под действием излучения с длиной волны 308 нм показали, что скорость испарения материала в зависимости от стадии глаукомы и от индивидуальных особенностей пациентов может изменяться в пределах 25%–30% при плотности энергии свыше 7 Дж/см<sup>2</sup>. Проведены экспериментальные исследования матриц возбуждения-эмиссии лазерно-индуцированной флуоресценции (ЛИФ) склеральной ткани глаза с использованием излучения лазера с длиной волны, перестраиваемой в диапазоне 210–355 нм. Обнаружены различия в спектрах ЛИФ склеральной ткани, обусловленные длиной волны возбуждения и стадией открытоугольной глаукомы.*

**Ключевые слова:** лазерно-индуцированная флуоресценция, воздействие мощного лазерного УФ излучения на биологические ткани, открытоугольная глаукома, оптические свойства биологических тканей, внутриглазная жидкость, импульсный УФ эксимерный лазер.

### 1. Введение

В настоящее время использование лазеров является неотъемлемой частью современной медицинской практики [1–4]. Наибольшее применение лазеры нашли в диагностике, терапии и хирургии. Главными преимуществами лазерных методов являются малоинвазивность, высокая скорость проведения операций, малый период реабилитации и уменьшение числа послеоперационных осложнений. Лазеры, работающие в различных областях спектра

(УФ, видимая и ИК), находят применение в разных областях медицины. В офтальмологии сегодня активно используются импульсные лазеры, излучающие в УФ области спектра (в основном это эксимерные лазеры и 4-я и 5-я гармоники Nd:YAG-лазеров). Разработаны различные методы, для реализации которых создано множество лазерных установок, получивших широчайшее распространение [5]. Основные области применения лазеров в офтальмологии – это коррекции аномалий рефракции, лечение вирусных заболеваний, а также антиглаукомные операции.

Лазерное лечение глаукомы давно зарекомендовало себя во всем мире как один из наиболее безболезненных и эффективных методов [6–11]. Обычно различают три стадии открытоугольной глаукомы. Как правило, 1-я стадия лечится медикаментозными способами. При развитии 2-й и 3-й стадий заболевания может применяться целый комплекс процедур [12], включая использование лазеров. Независимо от типа лазера лечение глаукомы направлено на нормализацию оттока внутриглазной жидкости и, следовательно, снижение внутриглазного давления. При этом лазер может использоваться в качестве как самостоятельного метода лечения глаукомы, так и в комбинации с микрохирургической антиглаукоматозной операцией [13]. По способу проведения различают *ab interno* и *ab externo* операции, когда воздействие на соответствующие отделы и ткани глаза осуществляется с внутренней или с внешней стороны глаза соответственно. К первому способу можно отнести достаточно распространенные сегодня лазерную трабекулотомию [14] и лазерную трабекулопластику [15]. Операции выполняются обычно при помощи аргоновых или диодных лазеров видимого диапазона спектра. Ко второму способу относится лазерная непроникающая глукбокая склерэктомия [16]. Нами был предложен и реали-

А.М.Ражев. Институт лазерной физики СО РАН, Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 15Б; Новосибирский государственный технический университет, Россия, 630073 Новосибирск, просп. К.Маркса, 20; e-mail: razhev@laser.nsc.ru

И.А.Искаков, О.В.Ермакова, А.Н.Трунов, В.В.Черных. Новосибирский филиал ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Федорова», Россия, 630096 Новосибирск, ул. Колхидская, 10  
Д.С.Чуркин. Институт лазерной физики СО РАН, Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 15Б; Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2; e-mail: churkin@laser.nsc.ru  
А.М.Оришнич. Институт теоретической и прикладной механики им. С.А.Христиановича СО РАН, Россия, 630090 Новосибирск, ул. Институтская, 4/1

Н.А.Маслов, Е.О.Цибульская. Институт теоретической и прикладной механики им. С.А.Христиановича СО РАН, Россия, 630090 Новосибирск, ул. Институтская, 4/1; Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2

А.А.Ломзов. Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2; Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 31 октября 2017 г., после доработки – 8 февраля 2018 г.

зован новый метод лазерной хирургии открытоугольной глаукомы на основе подобной методики [17].

Проведение лазерных антиглаукомных операций связано с воздействием мощного лазерного излучения на различные участки глаза, являющиеся биологическими тканями. Поэтому при разработке методик проведения операций необходимо определить оптимальные характеристики используемого излучения: длину волны, режим работы (импульсный или непрерывный), а также плотность энергии и интенсивность излучения на поверхности обрабатываемой ткани в зависимости от ее оптических свойств. В работах [18, 19] мы показали, что при проведении лазерных антиглаукомных операций *ab externo* оптимальным является использование излучения эксимерного ХеСl-лазера с длиной волны 308 нм. Были сделаны предварительные оценки порога абляции и скорости испарения склеральной ткани глаза человека в зависимости от плотности лазерной энергии на поверхности.

Вместе с тем остается открытым ряд вопросов, связанных с изменением оптических свойств склеральной ткани глаза при развитии открытоугольной глаукомы. В связи с этим целью настоящей работы является экспериментальное исследование оптических свойств склеральной ткани глаза больных открытоугольной глаукомой на ее различных стадиях.

## 2. Экспериментальная установка

В работе исследовалось воздействие мощного короткоимпульсного лазерного УФ излучения на склеральные ткани глаза человека, а также оптические характеристики этих тканей с использованием слабоинтенсивного импульсного лазерного УФ излучения, которое уже показало свою перспективность для диагностики состояния тканей глаза [20].

В первом случае использовался эксимерный ХеСl-лазер с  $\lambda = 308$  нм, энергией импульса излучения до 100 мДж и длительностью  $15 \pm 2$  нс на полувысоте. Проводились исследования зависимости скорости испарения для изолированных лоскутов склеральной ткани двух больных открытоугольной глаукомой 2-й стадии. Оптическая схема экспериментальной установки представлена на рис.1.

Излучение ХеСl-лазера поворотным зеркалом направлялось на фокусирующую линзу. Затем через щель шириной  $\sim 0.05$  мм излучение попадало на образец (склеральная ткань), торец которого был перпендикулярен лазерному пучку и находился максимально близко к щели, чтобы исключить изменение интенсивности лазерного излучения

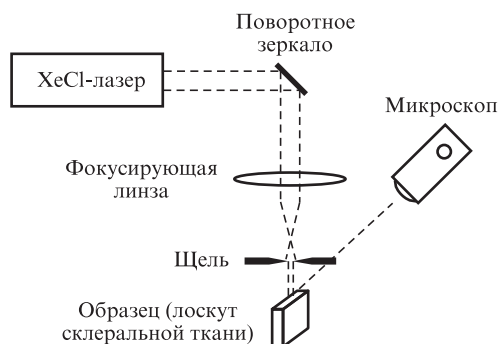


Рис.1. Оптическая схема экспериментальной установки для исследования воздействия мощного короткоимпульсного УФ лазерного излучения на склеральную ткань глаза.



Рис.2. Профиль каверны, оставаемой лазерным излучением с  $\lambda = 308$  нм в склеральной ткани глаза.

из-за его расходимости. Наблюдение за процессом абляции осуществлялось при помощи микроскопа. Скорость испарения определялась путем подсчета числа лазерных импульсов, требуемого для испарения лоскута склеры на заданную глубину.

На рис.2 приведен типичный профиль каверны, оставаемой лазерным излучением в результате испарения, так называемой лазерной раны.

Во втором случае проводилась регистрация спектров лазерно-индуцированной флуоресценции (ЛИФ) склеральной ткани глаза, пораженной открытоугольной глаукомой на 2-й и 3-й стадиях. Для исследования ЛИФ образцов использовался спектроскопический измерительный стенд (рис.3) на основе импульсно-периодического лазера *I Vibrant HE 355 II + UV* (Opotek, США) с оптопараметрическим преобразованием частоты, позволяющего получать перестраиваемое лазерное излучение в диапазоне длин волн 210–355 нм. После пространственного оптического фильтра на элементах 2–4 для контроля энергии импульса часть излучения ( $\sim 5\%$ ) с помощью полупрозрачной пластины из кварца 5 отводилась на фотодиод 7. После прохождения пластины 5 лазерный пучок направлялся зеркалом 8 на исследуемый образец 9, находящийся кювете из слабо флуоресцирующего материала – нержавеющей стали, флуоресценция которого с помощью сферического зеркала 10 направлялась на щель спектрометра 12 Action SP2300 (Princeton Instruments, США). Спектр регистрировался охлаждаемой ПЗС-матрицей с открытыми электродами Pixis 256 (Princeton Instruments, США). Входная щель спектрометра находилась в фокусе зеркала 10, и таким образом измерялся сигнал, усредненный по поверхности образца. Спектры ЛИФ образцов регистрировались при фиксированных длинах

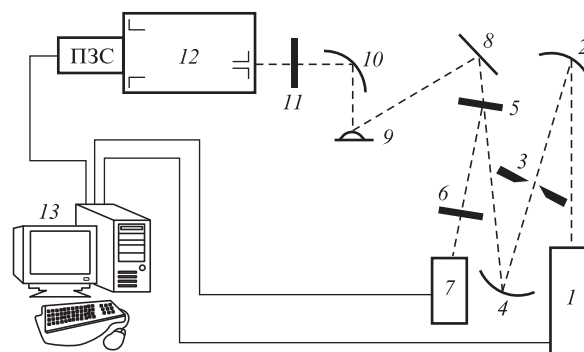


Рис.3. Схема экспериментальной установки по измерению матриц возбуждения-эмиссии ЛИФ:

1 – лазер; 2 – сферическое зеркало-конденсор; 3 – диафрагма; 4 – сферическое зеркало-коллиматор; 5 – полупрозрачное зеркало; 6 – матовая пластина; 7 – фотодиод ФД-24; 8 – зеркало; 9 – образец; 10 – собирающее сферическое зеркало; 11 – отсекающий лазерное излучение фильтр; 12 – спектрометр; 13 – компьютер.

волн возбуждающего лазерного излучения, изменяющихся в диапазоне 210–350 нм с шагом 10 нм. Проводить измерения с большим разрешением не было необходимо, поскольку характерная ширина линии возбуждения для биологических веществ составляет 40 нм и более. Для каждой длины волны возбуждения регистрация спектра каждого образца повторялась 5 раз. Затем каждый спектр нормировался на полную поглощенную энергию лазерного излучения, усреднялся и нормировался на спектральную чувствительность прибора, измеренную с помощью дейтериевой и вольфрамовой ламп. Плотность энергии лазерного импульса была ограничена величиной  $200 \text{ мкДж/см}^2$ , поскольку при ее превышении интенсивность в максимуме спектра флуоресценции начинала нелинейно зависеть от энергии лазерных импульсов, что делало нормировку на энергию лазерных импульсов некорректной. В нашем случае после нормировки на опорный сигнал среднеквадратичное отклонение интенсивностей измеренной флуоресценции не превышало 5%.

Для измерений матриц возбуждения-эмиссии использовали высушенные резецированные фрагменты склеры. Каждый образец представлял собой лоскут неправильной формы с характерным размером 3–4 мм и толщиной несколько десятых миллиметра. Спектры каждого фрагмента измеряли с каждой стороны по два раза, расправляя его между измерениями, чтобы свести к минимуму флуктуации, вызванные непостоянством геометрии сбора излучения.

### 3. Результаты и их обсуждение

Исследования воздействия мощного лазерного УФ излучения на склеральную ткань проводились в предположении, что скорости испарения подсушенного и влажного лоскутов ткани не будут сильно различаться, поскольку жидкость, смачивающая склеральную ткань, по большей части состоит из воды. Для подтверждения этого предположения предварительно исследовалась зависимость коэффициента поглощения раствора внутриглазной жидкости (ВГЖ) в дистиллированной воде (miliQ) в соотношении 1:10 от длины волны лазерного излучения с помощью спектрофотометра Cary 300 bio (Varian Inc., США). По результатам исследования впервые был получен спектр пропускания ВГЖ в УФ и синей областях спектра. Было установлено, что на длине волны 308 нм она практически не поглощает лазерное излучение (рис.4). Таким образом, возможное наличие жидкости, смачивающей склеральную ткань, не влияет на процесс абляции.

Порог абляции склеральной ткани для  $\lambda = 308 \text{ нм}$  был определен нами ранее [18, 19] и находится вблизи  $260 \text{ мДж/см}^2$ , поэтому в данном случае плотность энергии выбиралась заведомо большей – от 1 до  $20 \text{ Дж/см}^2$ . Результаты исследований представлены на рис.5. Видно, что при плотности энергии  $2 \text{ Дж/см}^2$  и дальнейшем ее увеличении толщина испаряемого слоя склеральной ткани непрерывно растет. При этом у двух имевшихся образцов максимальные скорости испарения заметно различались. Для первого образца эта скорость составляла  $14 \text{ мкм/имп.}$  в диапазоне плотностей энергии  $13\text{--}14 \text{ Дж/см}^2$ . При превышении плотности энергии  $15 \text{ Дж/см}^2$  толщина испаренного за один импульс слоя начинала уменьшаться. В то же время для второго образца максимальная скорость испарения не превышала  $9\text{--}10 \text{ мкм/имп.}$  при плотности энергии  $11 \text{ Дж/см}^2$ . Данный факт можно объяснить зави-

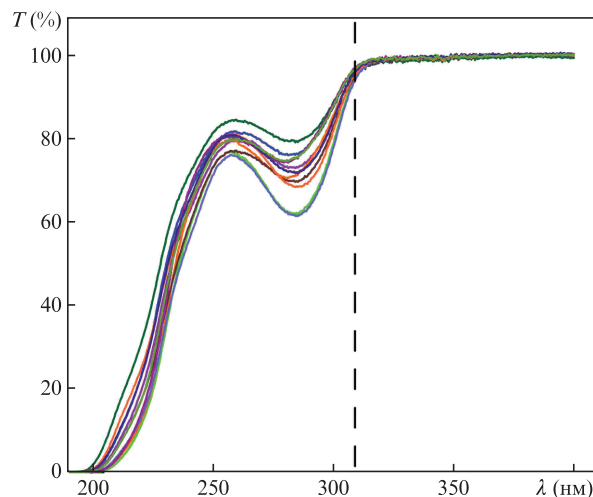


Рис.4. Спектры пропускания нескольких образцов внутриглазной жидкости. Вертикальной штриховой линией отмечена длина волны 308 нм. Толщина кюветы 10 мм.

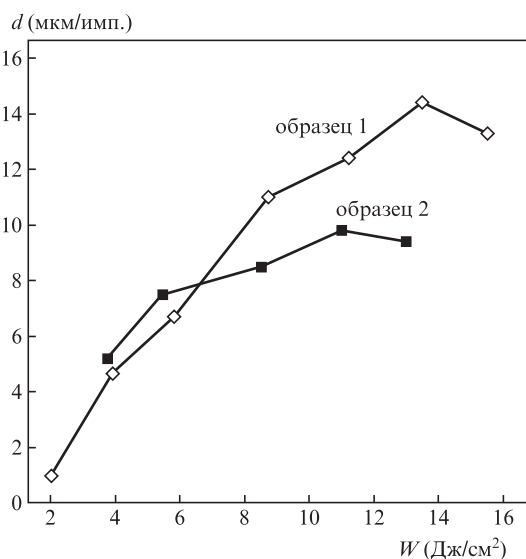


Рис.5. Зависимости скоростей испарения склеральной ткани глаза большого открытоугольной глаукомой на 2-й стадии для двух разных образцов от плотности лазерной энергии.

симостью оптических свойств тканей от индивидуальных особенностей пациентов. Поэтому для получения более полной и достоверной картины планируется проведение дополнительных исследований, связанных с набором статистических данных, по результатам которых можно будет определить средние скорости испарения ткани и соответствующую плотность энергии для 2-й стадии открытоугольной глаукомы. В то же время для проведения антиглаукомных операций можно ориентироваться на диапазон плотности энергии  $6\text{--}11 \text{ Дж/см}^2$ , поскольку при таких значениях уже обеспечивается относительно высокая скорость испарения материала, которая мало повлияет на общую продолжительность операции.

Исследование ЛИФ склеральной ткани имело целью выявить влияние на спектр ЛИФ развития открытоугольной глаукомы. Для первых экспериментов было выбрано по три образца склеральной ткани больных открытоугольной глаукомой 2-й и 3-й стадий. Типичные спектры ЛИФ представлены на рис.6. Полученные спектры были проанализированы методом главных компонент. Все они

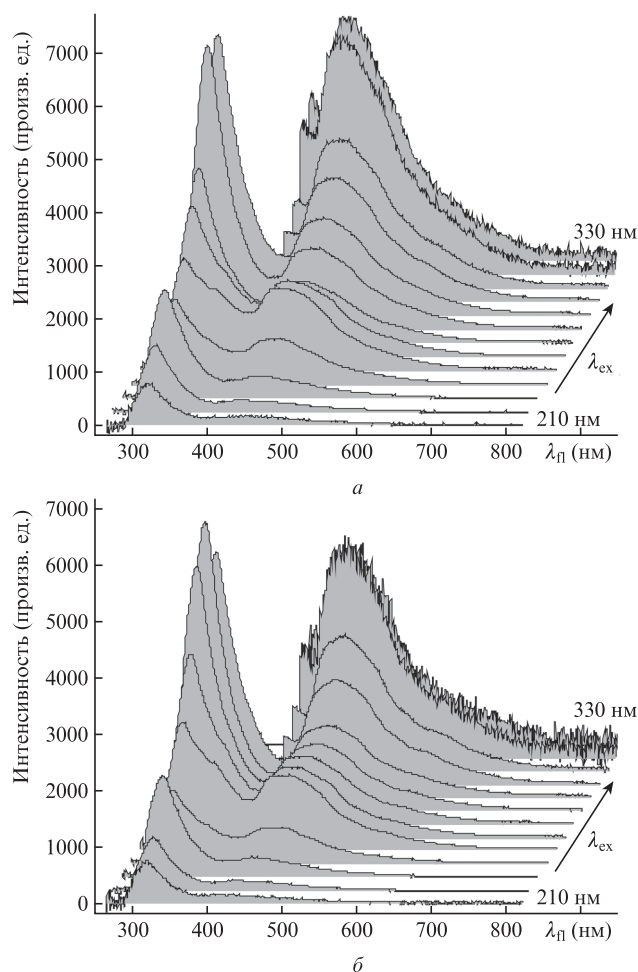


Рис.6. Примеры матриц возбуждения–эмиссии склеральных тканей при открытоугольной глаукоме 2-й (а) и 3-й (б) стадий.

хорошо описывались суммой четырех компонент, представленных на рис.7. Поскольку компоненты знакопеременные, то спектры реальных флуорофоров представляют собой их линейные комбинации, а так как любая положительно определенная линейная комбинация спектров главных компонент может претендовать на роль спектра флуорофора, их выбор определялся некоторыми дополнительными факторами [21]. В качестве определяющего фактора была выбрана ширина пика получившейся функции (характеризуется отношением максимума функции к ее интегралу) – сплошные спектры получаются в результате уширения отдельных линий, а значит, наиболее близкими к исходным должны быть самые узкие пики. Методом перебора были получены спектры в виде узких пиков, представленные на рис.7,б.

Типичные вклады компонент в спектры ЛИФ в зависимости от длины волны возбуждения приведены на рис.8. Видно, что спектры возбуждения для 3-й и 4-й компонент достаточно близки, при этом провалы в спектрах флуоресценции для 2-й и 4-й компонент совпадают с пиком 3-й. Опираясь на эти факты, а также на литературные данные, можно отнести этот пик (3-й) к реабсорбции флуоресценции в оксигемоглобине. Реабсорбция является нелинейным эффектом, поэтому спектр ЛИФ представляет собой результат перемножения спектров поглощения и флуоресценции, и для каждого образца наличие реабсорбции должно приводить к возникновению независимой компоненты. Однако в данном случае вклад реабсорбции в

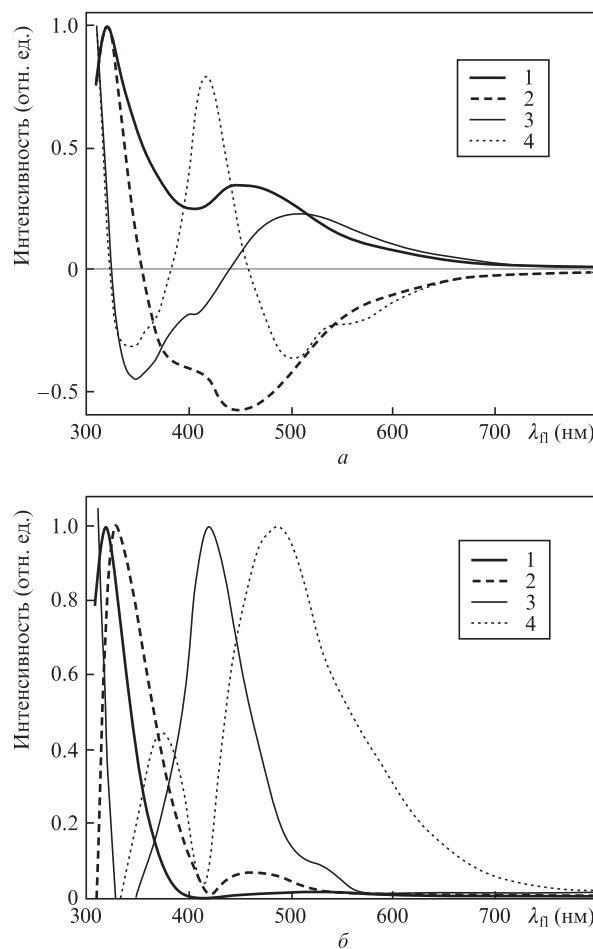


Рис.7. Спектры главных компонент (а) и полученные из них узкие пики интенсивности флуоресценции (б).

спектры ЛИФ мал и дает лишь усредненную поправку, равную в первом приближении для всех спектров. Таким образом, суммарный вклад 3-й компоненты должен быть отрицательным, а спектры реальных флуорофоров представляют собой линейные комбинации 3-й компоненты с любой из остальных. Однако, поскольку это – линейные преобразования, которые не влияют на соотношения прочих компонент, а реабсорбция связана с присутствием остаточной крови в образцах и не связана с патологией, 3-ю компоненту можно просто исключить из рассмотрения.

Поскольку вклад каждой из оставшихся компонент относительно вклада других может быть практически нулевым, можно сделать вывод, что их спектры с точностью до реабсорбции совпадают со спектрами реальных флуорофоров. Максимумы 1-й и 2-й компонент приходятся на  $\lambda = 321$  нм и  $\lambda = 332$  нм соответственно и обуславливаются различными состояниями триптофана (в зависимости от окружения пик флуоресценции триптофана может находиться на любой длине волны в диапазоне 320–360 нм). Четвертая компонента, скорее всего, принадлежит эластичной составляющей тканей. Ее спектр не похож на спектры известных поперечных связей в коллагене и эластине (максимум на  $\lambda = 380$  нм), однако также встречается в спектрах эластичных тканей [22].

Поскольку возбуждающее лазерное излучение в биологических тканях также поглощается нефлуоресцирующими хромофорами, спектры возбуждения каждого флуоро-

фора зависят от вкладов как хромофоров, так и других флуорофоров и поэтому не имеют простого представления. Таким образом, имеет смысл сравнивать только относительные вклады компонент. Как видно из рис.8, наибольшие различия вкладов компонент в спектры ЛИФ образцов, пораженных заболеванием на разной стадии, имеют место для длин волн возбуждения 230 и 280 нм. Предполагая, что эластичный каркас является базовой составляющей ткани, будем сравнивать вклады 4-й и двух других компонент. Это просто представить графически, выбрав отношения интенсивностей вкладов компоненты 4 ( $I_4$ ) к компонентам 1 ( $I_1$ ) и 2 ( $I_2$ ) в качестве координат, описывающих спектр ЛИФ (рис.9).

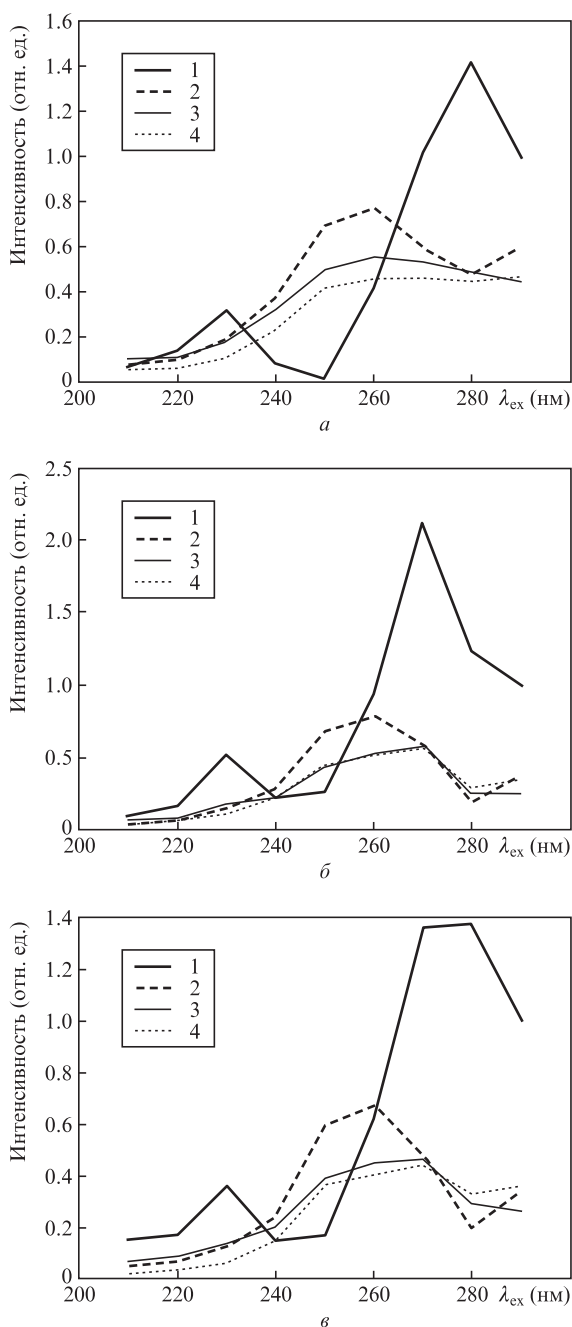


Рис.8. Примеры вкладов узких пиков в спектры ЛИФ образцов склеральных тканей, взятых у трех больных открытоугольной глаукомой 2-й (а) и 3-й (б, в) стадий в зависимости от длины волны возбуждения.

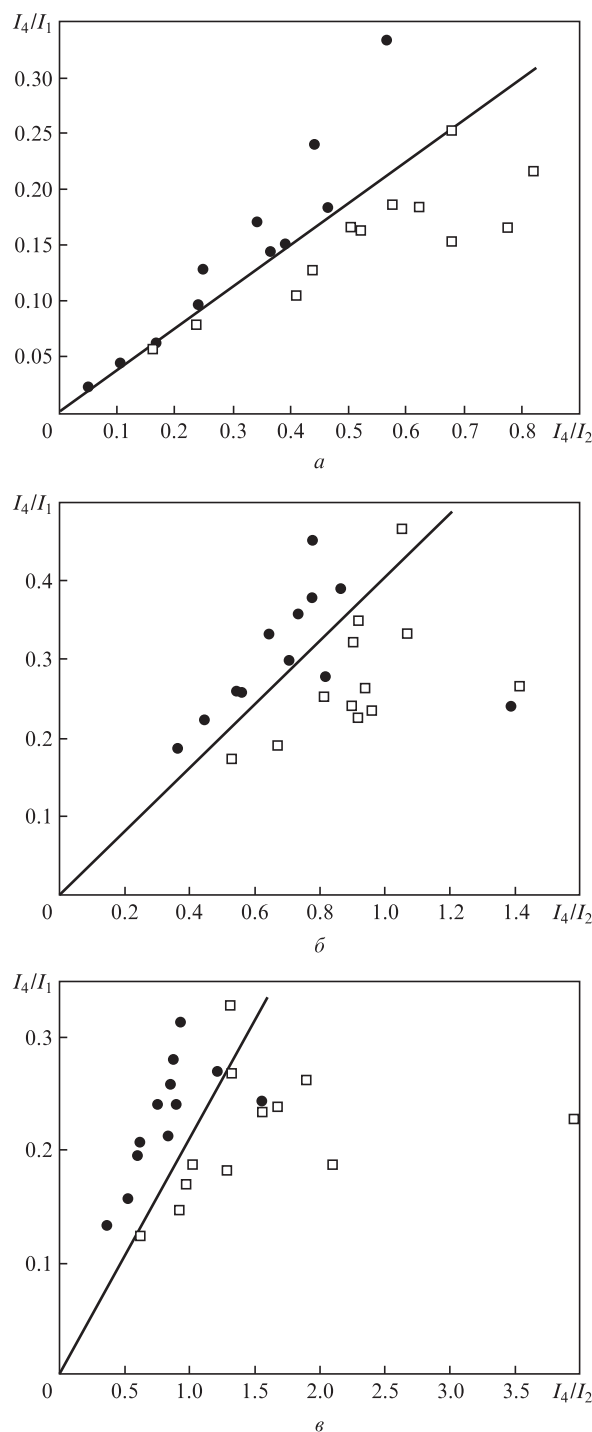


Рис.9. Относительный вклад флуоресцирующих компонент в спектры ЛИФ склеральных тканей больных глаукомой 2-й (●) и 3-й (□) стадий при  $\lambda_{ex} = 230$  (а), 270 (б) и 280 нм (в).

При таком представлении можно достаточно надежно разделить спектры ЛИФ в зависимости от стадий открытоугольной глаукомы (в данном случае – 2-я и 3-я). Кроме того, полученные данные о различиях в спектрах ЛИФ позволяют предположить, что при развитии открытоугольной глаукомы происходит структурное изменение и склеральной ткани. Для повышения достоверности использованного метода планируется проведение дальнейших исследований по накоплению статистических данных.

#### 4. Заключение

В работе экспериментально исследованы оптические свойства склеральной ткани глаза больных открытоугольной глаукомой различных стадий. Впервые получен спектр пропускания внутриглазной жидкости в УФ и синей областях спектра. Показано, что на длине волны 308 нм ВГЖ практически не поглощает лазерное излучение. Таким образом, возможное наличие смачивающей склеральную ткань жидкости не влияет на процесс абляции ткани излучением эксимерного ХеСІ-лазера.

Исследования процесса абляции склеральной ткани глаза человека под действием излучения с длиной волны 308 нм показали, что скорость испарения материала в зависимости от стадии глаукомы и с учетом индивидуальных особенностей пациентов может изменяться в пределах 25%–30% при плотности энергии свыше 7 Дж/см<sup>2</sup>.

Проведены экспериментальные исследования матриц возбуждения-эмиссии ЛИФ склеральной ткани глаза человека с использованием излучения лазера с длиной волны, перестраиваемой в области 210–355 нм. Продемонстрированы различия в спектрах ЛИФ склеральной ткани в зависимости от длины волны возбуждения и стадии открытоугольной глаукомы, что может свидетельствовать о соответствующих структурных изменениях склеральной ткани.

Работа выполнена при поддержке интеграционного проекта №68.

1. Krauss J.M., Puliafito C.A. *Lasers Surg. Med.*, **17**, 102 (1995).
2. Шахно Е.А. *Физические основы применения лазеров в медицине* (СПб: НИУ ИТМО, 2012, с. 129).
3. Ражев А.М. *Как это было...* (М.: ЛАС, 2015, ч. 5, с. 131).
4. Razhev A.M., Chernykh V.V., Bagayev S.N., Churkin D.S., Kargapol'tsev E.S., Iskakov I.A., Ermakova O.V. *J. Phys.: Conf. Ser.*, **793**, 012022 (2017).
5. Рой Ф.Х. (ред.). *Рефракционная хирургия* (М.: Логосфера, 2016, с. 236).
6. Антонюк С.В. Канд. дис. (Москва, ГУ МНТК «Микрохирургия глаза», 1999).
7. Ерескин Н.Н., Магарамов Д.А. *Тез. докл. регион. науч.-практ. конф. Урала Актуальные проблемы клинической офтальмологии* (Челябинск, 1999, с. 247).
8. Ерескин Н.Н., Дога А.В., Магарамов Д.А., Сугрбов В.А. *Патент РФ* №2192230 (2002).
9. Wilmsmeyer S., Philippin H., Funk J. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **244** (6), 670 (2006).
10. Мязунин И.Ю., Кичатая С.А., *Патент РФ* №2457816 (2012).
11. Соколовская Т.В. и др. *Патент РФ* № 2553507 (2014).
12. Vinod K., Gedde S.J. *Curr. Opin. Ophthalmol.*, **28** (2), 187 (2017).
13. Schacknow P.N., Samples J.R. (eds.). *The Glaucoma Book: A Practical, Evidence-Based Approach to Patient Care* (New York: Springer, 2010); DOI 10.1007/978-0-387-76700-0\_64.
14. Chockalingam M., Chirayath A. *Kerala J. Ophthalmol.*, **XIX** (1), 72 (2007).
15. Lee J.W.Y., Yau G.S.K., Yick D.W.F., Yuen C.Y.F. *Medicine*, **94** (49), 1 (2015).
16. Васильев Ж.В., Гусаревич О.Г., Искаков И.А., Лантух В.В., Пятин М.М., Ражев А.М. *Патент РФ* №2072817 (1997).
17. Ермакова О.В., Искаков И.А., Черных В.В., Ражев А.М., Чуркин Д.С., Каргапольцев Е.С. *Патент РФ* №2535079 (2013).
18. Ермакова О.В., Искаков И.А., Черных В.В., Трунов А.Н., Ражев А.М., Чуркин Д.С., Каргапольцев Е.С. *Вестник ОГУ*, **4** (153), 82 (2013).
19. Ермакова О.В., Искаков И.А., Черных В.В., Трунов А.Н., Ражев А.М., Чуркин Д.С., Каргапольцев Е.С., Потапова О.В., *Офтальмохирургия*, **4**, 98 (2013).
20. Maslov N.A., Larionov P.M., Rozhin I.A., Druzhinin I.B., Chernykh V.V. *Opt. Spectrosc.*, **120** (6), 983 (2016).
21. Maslov N.A., Papaeva E.O. *Techn. Phys. Lett.*, **42** (7), 718 (2016).
22. Subbotin D.V., Larionov P.M., Sergeevichev D.S., Subbotina O.A., Zaitsev G.S., Novruzov R.B., Orishich A.M., Malov A.N., Maslov N.A., Rozhin I.A., Lushnikova E.L., Nepomnyashih L.M. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **148** (4), 684 (2009).