

VILNIAUS UNIVERSITETAS
FIZINIŲ IR TECHNOLOGIJOS MOKSLŲ CENTRAS

EGLĖ GABRYTĖ

FEMTOSEKUNDINIŲ LAZERIO IMPULSŲ TAIKYMAS
REFRAKCINEI CHIRURGIJAI

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, fizika (02P)

Vilnius, 2015

Disertacija rengta 2011–2015 metais Vilniaus universitete

Mokslinis vadovas – dr. Mikas Vengris (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, fizika – 02P)

Turinys

Įvadas	7
1 Lazerinė refrakcinė chirurgija	15
1.1 Žmogaus akies sandara	15
1.2 Lazerinės refrakcinės chirurgijos procedūros	18
1.3 Šiuolaikinės lazerinės sistemos refrakcinei chirurgijai	23
1.3.1 Femtosekundinės aIR lazerinės sistemos	23
1.3.2 Lazerinės sistemos ragenos stromos abliacijai	25
1.4 Lazerinės spinduliuotės ir biologinių audinių sąveika	27
1.4.1 Fotoardymas	27
1.4.2 Fotoabliacija	33
2 Šiluminių reiškinių įtakos valdymas UV harmonikų genera- toriuje	36
2.1 Yb:KGW lazerio ketvirtosios harmonikos generatorius	38
2.2 Teorinis šiluminių reiškinių įtakos modeliavimas	49
2.3 Motorizuotas fazinio sinchronizmo išderinimo kompensavimas	52
2.4 Rezultatų aptarimas	55
3 Ragenos abliacija femtosekundiniais UV impulsais	57
3.1 Femtosekundinė lazerinė sistema	57
3.2 <i>Ex vivo</i> ragenos ir modelinių medžiagų abliacija	63
3.2.1 PMMA abliacija	64
3.2.2 Želatinos bandinių abliacija	67
3.2.3 <i>Ex vivo</i> kiaulės ragenos abliacija	69
3.3 <i>In vivo</i> triušio ragenos abliacija	72
3.3.1 Tyrimų metodika	73
3.3.2 Lazerinės sistemos parametrų pritaikymas <i>in vivo</i> eks- perimentams	81
3.3.3 Fotorefrakcinė keratektomija	87

3.3.4	Transepitelinė fotorefrakcinė keratektomija	90
3.4	Rezultatų aptarimas	101
4	UV spinduliuotės citotoksinis ir genotoksinis poveikis	104
4.1	Tyrimo metodai	104
4.2	UV spinduliuotės poveikis pelių kaulų čiulpų ir odos epitelio ląstelėms	108
4.3	Rezultatų aptarimas	113
5	Femtosekundinių aIR impulsų taikymas refrakcinėje regos chirurgijoje	115
5.1	Ragenos lopo formavimas naudojant f-theta objektyvą	118
5.2	Ragenos lopo ir refrakcinio pokyčio formavimas skenuojant didelės skaitinės apertūros lęšį	121
5.3	Rezultatų aptarimas	125
	Apibendrinimas	127

Sąvokų ir santrumpų žodynelis

aIR – artimosios infraraudonosios srities spinduliuotė

ArF – argono fluorido

BBO – β -bario boratas (BaB_2O_4)

BSS – [angl. *Balanced Salt Solution*] subalansuotų druskų tirpalas

DFJ – daugiafotonė jonizacija

DNR – deoksiribonukleorūgštis

ex vivo – [lot.] (bandymas, atliekamas) dirbtinėje aplinkoje, ne gyvame organizme

Fotoabliacija – procesas, kurio metu medžiaga šalinama intensyvia lazerio spinduliuote, nesukeliant terminio aplinkinių zonų pažeidimo

Fotoardymas – skaidriose terpėse vykstantis lazerinio ardymo procesas, kai ultratrumpojo impulso intensyvumas viršija plazmos generacijos slenkstinį intensyvumą ir įvyksta optinis pramušimas.

Femto-LASIK – lazerinė *in situ* keratomilezė, kurios metu ragenos lopus formuojamas femtosekundiniais infraraudonosios srities impulsais, o refrakcijos pokytis sukuriamas ragenos stromą abliuojant nanosekundiniais UV impulsais

FLEx – [angl. *Femtosecond Lenticule Extraction*] refrakcinė procedūra, kurios metu atvertus ragenos lopą pašalinamas femtosekundiniais impulsais išpjautas laužiamosios gebos pokytį atitinkantis vidinės ragenos stromos sluoksnis

FRK – [angl. *Photorefractive Keratectomy*] fotorefrakcinė keratektomija

FTK – [angl. *Phototherapeutic Keratectomy*] fototerapinė keratektomija

FWHM – [angl. *Full Width at Half Maximum*] smailės plotis pusės maksimumo aukštyje

in vivo – [lot.] (bandymas, atliekamas) gyvojoje sistemoje; gyvame organizme

in vitro – [lot.] (bandymas, atliekamas) ne natūralioje, dirbtinėje biologinėje aplinkoje

Yb:KGW – iterbiu legiruotas kalio gadolinio volframatas

LASEK – [angl. *Laser-Assisted Sub-Epithelial Keratectomy*] lazerinė subepitelinė keratektomija

LASIK – [angl. *Laser-Assisted in Situ Keratomileusis*] lazerinė *in situ* keratomilezė

PMMA – polimetilmetakrilatas $((C_5O_2H_8)_n)$

SmILE – [angl. *Small Incision Lenticule Extraction*] refrakcinė procedūra, kurios metu femtosekundiniais impulsais išpjautas laužiamosios gebos pokytį atitinkantis vidinės ragenos stromos sluoksnis pašalinamas ištraukiant jį pro siaurą įpjovą

TransFRK – transepitelinė fotorefrakcinė keratektomija

Ultratrumpasis impulsas – impulsas, kurio trukmė yra pikosekundžių (10^{-12} s) eilės arba trumpesnė

UV – ultravioletinio diapazono spinduliuotė

Įvadas

Refrakcinės regos ydos – trumparegystė, toliaregystė, presbiopija ir astigmatizmas – daro didelę įtaką žmogaus gyvenimo kokybei. Pastaraisiais dešimtmečiais visame pasaulyje trumparegystė diagnozuojama vis dažniau ir vis jaunesniems [1–7]. Pavyzdžiui, kai kuriuose Azijos regionuose šiandien daugiau kaip 90 % paauglių yra trumparegiai [1, 8]. Ir nors trumparegystės paplitimas smarkiai skiriasi skirtingose etninėse grupėse [7], bendras trumparegystės atvejų skaičiaus didėjimas stebimas visame pasaulyje ir yra siejamas su tuo, kad vis daugiau laiko žmonės praleidžia skaitydami ar dirbami su kompiuteriu [9, 10]. Nenuostabu jog nemažai atliktų tyrimų rodo koreliaciją tarp išsilavinimo lygio ir trumparegystės laipsnio [10–13]. Ne išimtis ir Lietuva – remiantis 2013 m. Lietuvos Sveikatos apsaugos ministerijos duomenimis per ketverius metus nuo 2010 m. gydymo įstaigose užregistruotų trumparegystės atvejų padaugėjo nuo 57,6 iki 63,5, o toliaregystės – nuo 58,5 iki 96,7 tūkstančiui gyventojų. Nors daugeliu atvejų refrakcinės ydos netgi nėra traktuojamos kaip liga (nes gali būti visiškai koreguojamos akiniais arba kontaktiniais lęšiais), didelės refrakcinės ydos gali sukelti kitas akių ligas: kataraktą, glaukomą, tinklainės ligas ir netgi aklumą [14].

Lazerinė refrakcinė chirurgija – tai alternatyva akiniais ir kontaktiniams lęšiams, kuri leidžia pagerinti paciento gyvenimo kokybę. Šiandien viena iš dažniausiai atliekamų lazerinės refrakcinės chirurgijos procedūrų yra lazerinė *in situ* keratomilezė (LASIK) [15]. Šios procedūros metu chirurginiu skalpeliu arba femtosekundine artimosios infraraudonosios srities (aIR) lazerine spinduliuote (tada procedūra vadinama Femto-LASIK [16]) atpjaujamas plonas viršutinis ragenos sluoksnis (lopas), o jį atvertus gilesniuose stromos audiniuose ultravioletiniais (UV) nanosekundiniais impulsais formuojamas refrakcijos pokytis. Po procedūros atgal užklotas ragenos lopus gražina ragenos paviršiaus optinę kokybę.

Pirmą kartą femtosekundiniais impulsais ragenos lopus žmogaus akyje buvo atpjautas gana neseniai, 2001 m. [17]. Nuo to laiko femtosekundiniai lazeriai įsitvirtino oftalmologijoje dėl itin tikslų ir taisyklingos geometrijos

intraštominių pjūvių [18], didesnio saugumo [19–22], greitesnio pooperacinio gijimo ir geriau prognozuojamų refrakcinės chirurgijos baigčių [23, 24]. Didžiausias Femto-LASIK procedūros trūkumas yra tai, kad vienai procedūrai atlikti reikia dviejų lazerinių sistemų, kurios generuoja femtosekundinius aIR ir nanosekundinius UV impulsus. Dėl to gydytojas turi išmokti valdyti abi sistemas (dažniausiai skirtingų gamintojų), kiekvieną kartą atskirai abiem lazeriams nustatyti procedūros parametrus; taip pat operacijos metu tenka perkelti pacientą nuo vienos sistemos prie kitos. Visa tai ilgina bendrą Femto-LASIK procedūros trukmę ir kelia nepatogumų tiek gydytojui, tiek pacientui. Nėgana to, abi lazerinės sistemos yra brangios bei užima nemažai vietos.

Situacija smarkiai pasikeistų, jeigu visa LASIK procedūra būtų atliekama naudojant vieną lazerinę sistemą. Per pastarąjį dešimtmetį smarkiai patobulėjus kietakūnių femtosekundinių lazerių technologijoms, atsirado techninė galimybė turėti vieno Yb:KGW lazerio pagrindu veikiančią šviesos šaltinį, generuojantį ir UV, ir aIR srities femtosekundinius impulsus. Mūsų tikslas – ištirti, ar tokio lazerinio šaltinio pagrindu sukurta refrakcinės regos korekcijos sistema galėtų pakeisti ir aIR, ir UV srities lazerius, šiuo metu naudojamus refrakcinei chirurgijai.

Siekiant šio tikslo buvo suformuluoti pagrindiniai uždaviniai:

1. Surinkti ir optimizuoti femtosekundinio Yb:KGW lazerio penktosios harmonikos (205 nm) generatorių ir, optimizavus lazerinės sistemos parametrus, įvertinti *ex vivo* ir *in vivo* ragenos stromos abliacijos spartą.
2. Optimizuoti abliacijos algoritmą išlaikant minimalų šiluminį poveikį ragenos audiniams, aukštą paviršiaus kokybę bei didelę trumparegystės korekcijos spartą.
3. Įvertinti femtosekundiniais UV impulsais operuotų *in vivo* triušio ragenų paviršiaus kokybę, gijimo tendencijas ir patologinius pakitimus bei palyginti šiuos rezultatus su gautaisiais naudojant komercinę nanosekundinę argono fluorida (ArF) lazerinę sistemą.
4. Pritaikyti Yb:KGW lazerinės sistemos aIR srities impulsus LASIK ragenos lopo pjūvimui ir laužiamąją ragenos gebą keičiančių tūrinių darinių formavimui. Ištirti, kaip suformuotų darinių optinė kokybė, tikslumas ir atkartojamumas priklauso nuo pluošto fokusavimo sistemos bei lazerinės spinduliuotės parametrų.
5. Įvertinti femtosekundinės ultravioletinės spinduliuotės citotoksiškumą¹ ir

¹Citotoksinis – ([gr.] kytos – ląstelė + [gr.] toksikon – nuodai) žudantis

genotoksinį² poveikį gyvoms ląstelėms bei palyginti jį su kitų ultravioletinės spinduliuotės šalinių poveikiu.

Ginamieji teiginiai

1. Dideliu pasikartojimo dažniu veikiančių ketvirtosios ir aukštesniųjų harmonikų femtosekundinių impulsų generatorių spinduliuotės moduliavimo spartą riboja UV spinduliuotės sugertis netiesiniuose kristaluose. Moduliavimo spartą galima padidinti tūkstančius kartų adaptyviai valdant netiesinio optinio kristalo fazinio sinchronizmo derinimo kampaną.
2. Femtosekundiniais Yb:KGW kietakūnio lazerio fundamentinės aIR spinduliuotės impulsais ragenos lopus suformuojamas tiksliai ir atkartojamai; ši lazerinė sistema lopo formavimo procedūros trukme nenusileidžia šiuolaikinėms komercinėms sistemoms.
3. Femtosekundinė Yb:KGW lazerinė sistema ragenos stromos abliacijos sparta ir kokybe prilygsta komercinėms eksimerinėms ArF lazerinėms sistemoms.
4. Citotoksinis ir genotoksinis UV spinduliuotės poveikis ląstelei stipriai priklauso nuo bangos ilgio ir beveik nepriklauso nuo impulso trukmės. Esant vienodomis apšvitos dozėms, femtosekundinių 205 nm bangos ilgio impulsų genotoksinis poveikis neviršija oftalmologinėms procedūroms naudojamų nanosekundinių UV impulsų genotoksinio poveikio.
5. Dauguma lazeriu atliekamų šiuolaikinių refrakcinių akies ydų korekcijos procedūrų, gali būti atliktos naudojant vieną femtosekundinę Yb:KGW kietakūnę lazerinę sistemą su penktosios harmonikos generatoriumi.

Mokslinio darbo naujumas ir reikšmė

Yra žinoma, kad šiluminiai reiškiniai UV harmonikų generatoriuose mažina generavimo efektyvumą, blogina pluošto charakteristikas bei keičia fazinio sinchronizmo sąlygas [25, 26]. Kai konvertuojami ilgi nanosekundiniai ar pikosekundiniai impulsai, šiluminių reiškinų įtaka mažinama naudojant įvairius kristalo aušinimo metodus [27–29]. Tačiau generuojant didelio pasikartojimo dažnio (dešimčių kilohercų ir daugiau) ultratrumpuosius UV ląstele

²Genotoksinis – pažeidžiantis ląstelės DNR

impulsus, paprastai naudojami itin ploni (iki 1 mm storio) netiesiniai optiniai kristalai, kuriems praktiškai pritaikyti standartinius aušinimo metodus beveik neįmanoma. Šiame darbe pirmą kartą išsamiai charakterizuoti pereinamieji reiškiniai kelių dešimčių kilohercų pasikartojimo dažniu veikiančio femtosekundinio lazerio UV harmonikų generatoriuje. Pasiūlyti nauji šiluminų reiškinų įtakos sumažinimo būdai, kurie galėtų būti pritaikomi lazeriniam medžiagų apdirbimui. Tai leistų sumažinti vidutinės spinduliuotės galios svyravimus laike bei pagreitinti lazerinio apdirbimo procesus.

Kietojo kūno nanosekundiniai lazeriai su UV harmonikų generatoriais refrakcinėje akių chirurgijoje taikomi nuo 2004 m. [30, 31]. Ir nors ragenos stromos abliacijos rezultatai visiškai tenkina refrakcinei chirurgijai keliamus reikalavimus [32–34], šioms sistemoms nėra lengva konkuruoti su tradicinėmis eksimerinėmis ArF lazerinėmis sistemomis, kurios toms pačioms refrakcinės regos korekcijos procedūroms pradėtos taikyti kur kas anksčiau [35]. Mūsų žiniomis, šiame darbe pristatoma ragenos stromos abliacija femtosekundinio Yb:KGW kietojo kūno lazerio penktosios harmonikos (205 nm) impulsais buvo atlikta pirmą kartą. Lyginant su nanosekundiniais impulsais, femtosekundiniai impulsai pasižymi tuo, kad dėl trumpesnės sąveikos trukmės abliacijos metu ragenos paviršius mažiau kaista.

Šiuo metu jokia lazerinė sistema, galinti atlikti ir stromos abliaciją, ir ragenos lopo formavimą, nėra komerciškai prieinama. Nors „Katana Technologies“ (Vokietija) jau kuris laikas savo elektroninėje svetainėje skelbia apie tokį produktą [36], jokių su šia sistema susijusių publikacijų rasti nepavyko. Mūsų darbe pademonstruota galimybė viena femtosekundine lazerine sistema atlikti pilną Femto-LASIK procedūrą. Sukūrus universalią femtosekundinę lazerinę sistemą palengvėtų chirurgo darbas: LASIK operacija truktų trumpiau, nes nereiktų perkelti paciento ir derinti dviejų lazerinių sistemų, viena integruota valdymo sistema abiemis LASIK procedūros etapams sumažintų klaidos tikimybę, ta pačia sistema būtų galima atlikti ir kitas, vien tik femtosekundiniais impulsais atliekamas procedūras: keratoplastikos operacijas, refrakcijos ir presbiopijos korekciją.

Yra žinoma, kad trumpesnio UV bangos ilgio spinduliuotė (193–210 nm) sukelia žymiai mažesnę genotoksinę poveikį ląstelėse nei ilgesnio, ~ 260 nm bangos ilgio spinduliuotė [37, 38]. Tačiau iki šiol nebuvo ištirta, kaip keičiasi citotoksinis ir genotoksinis spinduliuotės poveikis trumpėjant impulso trukmei, kai šviesos intensyvumas skiriasi tūkstančius kartų. Mes įvertinome femtosekundinės UV spinduliuotės citotoksinį ir genotoksinį poveikį pelių kaulų čiulpų ir odos epitelio ląstelėms bei palyginome gautus rezultatus

su kitų UV spinduliuotės šaltinių poveikiais. Lyginant su nanosekundiniais 213 nm impulsais, didesnis femtosekundinių 205 nm impulsų citotoksinis poveikis ląstelėms esant panašiam genotoksiniam poveikiui gali būti laikomas privalumu, nes mažėja tikimybė, kad mutavusi ląstelė (su pažeista ir netinkamai atkurta DNR) sugebės replikuotis.

Publikacijų sąrašas

1. E. Gabryte, S. Sobutas, M. Vengris, R. Danielius, Control of thermal effects in fast-switching femtosecond UV laser system, *Appl. Phys. B* **120**(1), 31-39 (2015).
2. E. Danieliene, E. Gabryte, M. Vengris, O. Ruksenas, A. Gutauskas, V. Morkunas, R. Danielius, High-speed photorefractive keratectomy with femtosecond ultraviolet pulses, *J. Biomed. Opt.* **20**(5), 051037 (2015).
3. E. Danieliene, E. Gabryte, R. Danielius, M. Vengris, A. Vaiceliunaite, V. Morkunas, O. Ruksenas, Corneal stromal ablation with femtosecond ultraviolet pulses in rabbits, *J. Cataract Refract. Surg.* **39**, 258-267 (2013).
4. E. Gabryte, E. Danieliene, A. Vaiceliunaite, O. Ruksenas, M. Vengris, R. Danielius, All-femtosecond laser-assisted *in situ* keratomileusis, *Proc. SPIE* **8567**, Ophthalmic Technologies XXIII, 85671S-85671D-7 (2013).
5. V. Morkunas, O. Ruksenas, M. Vengris, E. Gabryte, E. Danieliene, R. Danielius, DNA damage in bone marrow cells induced by ultraviolet femtosecond laser irradiation, *Photomed. Laser Surg.* **29**(4), 239-244 (2011).
6. M. Vengris, E. Gabryte, A. Aleknavicius, M. Barkauskas, O. Ruksenas, A. Vaiceliunaite, R. Danielius, Corneal shaping and ablation of transparent media by femtosecond pulses in deep ultraviolet range, *J. Cataract Refract. Surg.* **36**(9), 1579-1587 (2010).

Rezultatai buvo pristatyti šiose konferencijose:

1. S. Sobutas, E. Gabryte, R. Danielius, Femtosekundinių ultravioletinių impulsų generavimas: šiluminiai reiškiniai ir jų valdymas, 41-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija (Vilnius, Lietuva, 2015).

2. S. Sobutas, E. Gabryte, Control of thermal effects in high harmonics generator of solid-state femtosecond laser, Open readings 2015 (Vilnius, Lietuva, 2015).
3. E. Gabryte, E. Danieliene, A. Vaiceliunaite, O. Ruksenas, M. Vengris, R. Danielius, High-speed transepithelial corneal ablation using a solid-state femtosecond laser based system, Laser Applications in Life Sciences (Ulmas, Vokietija, 2014).
4. E. Gabryte, M. Vengris, R. Danielius, Thermal effects in the fourth harmonic generator of femtosecond Yb:KGW laser, Open readings 2014 (Vilnius, Lietuva, 2014).
5. E. Gabryte, E. Danieliene, A. Vaiceliunaite, O. Ruksenas, M. Vengris, R. Danielius, Universali femtosekundinė lazerinė sistema regos ydų korekcijai, Ketvirtoji jaunųjų mokslininkų konferencija „Fizinių ir technologijos mokslų tarpdalykiniai tyrimai“ (Vilnius, Lietuva, 2014).
6. E. Gabryte, E. Danieliene, A. Vaiceliunaite, O. Ruksenas, M. Vengris, R. Danielius, Complete LASIK procedure using a solid-state femtosecond laser based system, European Conferences on Biomedical Optics (Miunchenas, Vokietija, 2013).
7. E. Gabryte, E. Danieliene, A. Vaiceliunaite, O. Ruksenas, M. Vengris, R. Danielius, Lazerinė refrakcinė regos korekcija LASIK naudojant vien tik femtosekundinę kietakūnę lazerinę sistemą, 40-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija (Vilnius, Lietuva, 2013).
8. E. Gabryte, E. Danieliene, A. Vaiceliunaite, O. Ruksenas, M. Vengris, R. Danielius, All-femtosecond laser-assisted *in situ* keratomileusis, Photonics West (San Franciskas, JAV, 2013)
9. E. Gabryte, M. Vengris, R. Danielius, E. Danieliene, A. Vaiceliunaite, Ragenos lopo formavimas femtosekundinio kietakūnio Yb:KGW lazerio impulsais, 39-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija (Vilnius, Lietuva, 2011).
10. E. Gabryte, M. Vengris, R. Danielius, O. Ruksenas, A. Vaiceliunaite, E. Danieliene, Femtosecond solid-state UV laser system for the refractive eye surgery, Open readings 2011 (Vilnius, Lietuva, 2011).
11. E. Gabryte, M. Vengris, R. Danielius, O. Ruksenas, A. Vaiceliunaite, Efficient ablation of *ex vivo* cornea using the fifth harmonic of femtosecond Yb:KGW laser, Open readings 2010 (Vilnius, Lietuva, 2010).

12. E. Danieliene, R. Danielius, E. Gabryte, O. Ruksenas, A. Vaiceliunaite, M. Vengris, Corneal stromal ablation by femtosecond UV pulses: in vivo study, The World Ophthalmology Congress (Berlynas, Vokietija, 2010).
13. E. Danieliene, R. Danielius, E. Gabryte, V. Morkunas, O. Ruksenas, A. Vaiceliunaite, M. Vengris, Ablation of rabbit cornea by femtosecond ultraviolet pulses, The XIII Forum Ophthalmologicum Balticum (Vilnius, Lietuva, 2010).
14. E. Gabryte, M. Vengris, R. Danielius, O. Ruksenas, A. Vaiceliunaite, Efficient ablation of *ex vivo* cornea using the fifth harmonic of femtosecond Yb:KGW laser, Biomedical Engineering (Vilnius, Lietuva, 2009).
15. E. Gabryte, A. Aleknavicius, R. Danielius, M. Vengris, Efficient ablation of *ex vivo* cornea by the fifth harmonic of femtosecond Yb:KGW laser, Northern Optics (Vilnius, Lietuva, 2009).
16. E. Gabryte, M. Vengris, A. Aleknavicius, R. Danielius, Efektyvus antrosios, ketvirtosios ir penktosios harmonikos generatorius femtosekundiniam Yb:KGW lazeriui, 38-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija (Vilnius, Lietuva, 2009).
17. E. Gabryte, M. Vengris, A. Aleknavicius, R. Danielius, Corneal shaping by femtosecond UV laser pulses, 38-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija (Vilnius, Lietuva, 2009).

Autorės ir bendraautorių indėlis

Šioje disertacijoje aprašomi tarpdisciplininiai tyrimai, kuriuos atliko skirtingų sričių specialistų grupė. Aprašydama tyrimų metodiką bei rezultatus autorė labiausiai koncentruojasi ties fizikiniais reiškiniiais (biologinių terpių ir femtosekundinės spinduliuotės sąveikos mechanizmais, aukštesniųjų lazerio harmonikų generacija, femtosekundinių impulsų optika) bei technine tyrimų puse (lazerinė sistema ir jos pritaikymas refrakcinei chirurgijai, spinduliuotės parametrai, spinduliuotės ir medžiagos sąveikos kiekybiniai ir kokybiniai vertinimai). Autorė surinko visas eksperimentams naudotas optines schemas, kūrė teorinius modelius, atliko kompiuterinius skaičiavimus, kūrė lazerinės sistemos, variklių bei skenerių valdymo programas, atliko modeliinių medžiagų abliacijos bei *ex vivo* ragenos lopo formavimo eksperimentus, apdorojo bei apipavidalino rezultatus. Visų *in vivo* operacijų bei genotoksiškumo tyrimų metu buvo atsakinga už lazerinės sistemos parengimą bei valdymą.

Ivadas

Dr. R. Daničius ir dr. M. Vengris koordinavo visus eksperimentus bei teikė visokeriopą pagalbą techniniais ir teoriniais klausimais. S. Sobutas padėjo atliekant eksperimentus su *ex vivo* ragenomis bei programuojant motorizuotą ketvirtosios harmonikos modulio valdymą.

Atliekant *in vivo* triušių ragenos abliacijos eksperimentus kartu dirbo oftalmologė dr. E. Danielienė, kuri parengė operacijos protokolą, kontroliavo operacijų eigą bei vertino pooperacinių gyvūnų gijimą. Operacijų metu biologai prof. O. Rukšėnas ir A. Vaičiūnaitė prižiūrėjo elgesį su gyvūnais, ruošė juos operacijoms bei atliko enukleacijas.

Genotoksiškumo tyrimams ląstelių mėginius ruošė, rezultatų apdorojimą ir analizę atliko dr. Vaidotas Morkūnas ir Gintarė Urbonaitė.

1 skyrius

Lazerinė refrakcinė chirurgija

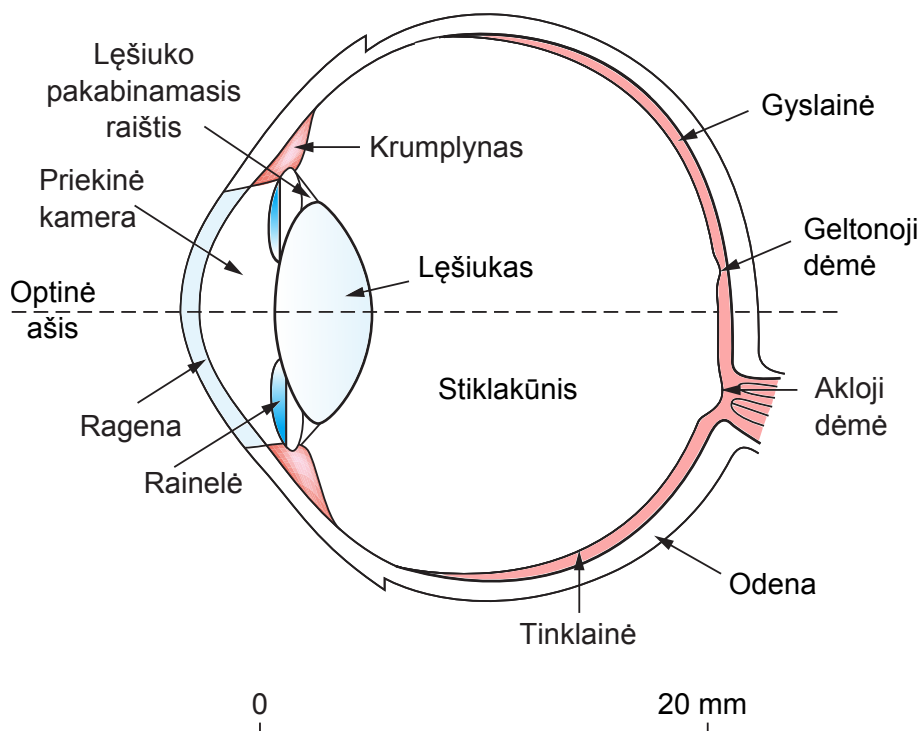
Refrakcinės akių chirurgijos tikslas – pagerinti akies refrakcinę funkciją ir išlaisvinti pacientą nuo akinių bei kontaktinių lęšių. Dažniausiai refrakcinės chirurgijos procedūros atliekamos kliento noru, dėl asmeninio komforto, o tik gana retais atvejais jas skiria gydytojas. Lazerio spinduliuote galima ištaisyti ne tik tas regos ydas, kurios gali būti koreguojamos akiniais, t. y. miopiją (trumparegystę), hipermetropiją (toliaregystę), astigmatizmą bei presbiopiją, tačiau ir koreguoti arba bent jau pristabdyti degeneracinio pobūdžio keratokonusą (gaubtumo kitimą dėl ragenos plonėjimo) [39]. Kadangi didžiosios dalies visų lazerinės refrakcinės chirurgijos procedūrų esmė yra modifikuoti ragenos formą, todėl verta plačiau aptarti žmogaus akį ir jos ragenos anatominę struktūrą.

1.1 Žmogaus akies sandara

Žmogaus akis yra sudėtingas organas, kurio dėka mes galime matyti ir orientuotis aplinkoje. Akis reaguoja į elektromagnetines bangas regimojoje spektro srityje (nuo 400 nm iki 700 nm) [40] ir verčia jas nerviniais signalais. Didžioji dalis žinių apie išorinį pasaulį gaunama būtent per regą – atpažįstami aplinkos daiktai, suvokiamas jų judėjimas, padėtys bei atstumai, įsisavinama grafinė informacija.

Žmogaus akis nėra taisyklingos sferos formos, jos priekinė dalis yra šiek tiek gaubtesnė. Akies obuolio ašinis ilgis yra apytiksliai 23 mm, o vertikalus ir horizontalus skersmuo – apie 24 mm. Akies horizontalus pjūvis ir pagrindinės dalys pavaizduotos 1.1 pav. Šviesa į akį patenka pro rageną – skaidrų jungiamojo audinio sluoksnį. Normali žmogaus ragena ploniausia būna centre, jos storis ten yra $\sim 0,5$ mm, o periferijoje – $\sim 0,7$ mm. Vidutinis žmogaus ragenos lūžio rodiklis $n \approx 1,376$. Dėl gana didelio oro ir ragenos

1. Lazerinė refrakcinė chirurgija



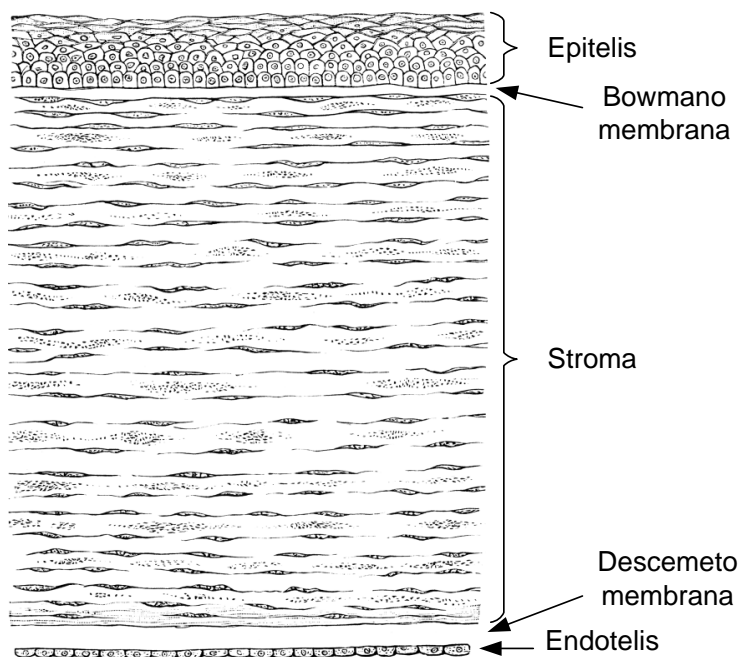
1.1 pav. Žmogaus akies horizontalaus pjūvio schematinis vaizdas. Apačioje pažymėtas apytikslis mastelis. Adaptuota iš [40].

lūžių rodiklių skirtumo maždaug $2/3$ visos akies laužiamosios gebos tenka ragenai [38, 39, 41].

Ertmė tarp ragenos ir rainelės vadinama priekine kamera, ji yra užpildyta vandeningu skysčiu ($n \approx 1,336$), o jos storis siekia 3 mm. Akies rainelė veikia kaip kintančio skersmens diafragma, ji kontroliuoja į akį patenkančios spinduliuotės kiekį ir akies skaitinę apertūrą. Lūžio rodiklių skirtumas tarp lęšiuko ir priekinės kameros bei stiklakūnio (esančio už lęšiuko) yra gana nedidelis ($\sim 0,08$), dėl to lęšiukui tenka $1/3$ visos akies laužiamosios gebos [39, 41]. Svarbiausia akies lęšiuko savybė – elastingumas ir gebėjimas lengvai keisti išgaubtumą bei akies laužiamąją gebą taip, kad nuo akies tam tikru atstumu nutolę daiktai būtų gerai matomi. Ši akies savybė vadinama akomodacija. Praėjusi pro lęšiuką šviesa sklinda stiklakūniu, o vaizdas projektuojamas ant tinklainės. Čia šviesos signalas pakeičiamas į nervinį impulsą ir nerviniais regos takais perduodamas smegenų žievei.

Rageną yra skaidrus audinys, kurio pagrindinės funkcijos – laužti šviesos spindulius nukreipiant juos per lęšiuką į tinklainę bei saugoti akį nuo fizinių sužeidimų ir žalingo aplinkos poveikio.

Žmogaus rageną yra išgaubta ir asferinės formos. Centre priekinio ragenos paviršiaus kreivumas yra didesnis nei periferijoje. Ragenos laužiamoji geba yra 40–44 D [39, 41], todėl net maži ragenos formos ar storio pokyčiai



1.2 pav. Žmogaus ragenos skerspjūvis. Ragenos sluoksnių proporcijos yra išlaikytos. Adaptuota iš [42].

gali sukelti reikšmingus vaizdo iškraipymus ir refrakcines regos ydas. Dar viena unikali ragenos savybė – skaidrumas, kurį užtikrina tvarkinga audinio struktūra ir maži lūžio rodiklio svyravimai.

Žmogaus ragenos skersinis pjūvis schematiškai pavaizduotas 1.2 pav. Žmogaus ragena susideda iš penkių sluoksnių: epitelio, Bowmano membranos, stromos, Descemeto membranos ir endotelio. Priekinis ragenos paviršius būna padengtas ašarų sluoksniu, o vidinį skalauja intraokulinis skystis.

Epitelis yra viršutinis ragenos sluoksnis, kuris vienintelis visoje ragenoje geba atsinaujinti. Jį sudaro 5–6 ląstelių sluoksniai, kurių bendras storis $\sim 50 \mu\text{m}$ [38, 39, 43]. Epitelio sluoksnis yra labai lygus ir drėgnas. Jis saugo gilesnius ragenos sluoksnius nuo aplinkos poveikio bei užtikrina puikų matymą. Dar viena svarbi epitelio funkcija – apsauga nuo ragenos stromos tinimą ir uždegimą galinčio sukelti ašarų įsiskverbimo į ragena.

Bowmano membrana yra 8–12 μm storio, ją sudaro atsitiktinai išsidėsčiusios kolageno skaidulos (fibrilės) ir į baltymus panašūs proteoglikanai. Šis sluoksnis padidina ragenos paviršiaus lygumą ir padeda epitelio ląstelėms geriau prisitvirtinti [43].

90 % viso ragenos storio (450–500 μm) sudaro mechaniškai tvirtas sluoksnis – *stroma*. Tik 2–3 % viso stromos tūrio užima ląstelės, likusi dalis – tarpląstelinė matrica, sudaryta iš kolageno, vandens, proteoglikanų, glikozaminglikanų ir kitų baltymų, kurie geba sugerti 1000 kartų didesnį vandens

1. Lazerinė refrakcinė chirurgija

tūrį, nei kad patys užima. Apie 90 % stromos audinio (neįskaitant vandens) sudaro skirtingų tipų kolageno skaidulos, kurios jungdamosi tarpusavyje formuoja plonus 1–2 μm sluoksnius [44]. Ragenos stromos paviršiniuose sluoksniuose kolageno skaidulos yra išsidėsčiusios tankiau nei apatiniuose, dėl to viršutinis ragenos sluoksnis padeda ragenai išlaikyti pastovų gaubtumą bei suteikia biomechaninį stabilumą [45, 46]. Taip pat dėl skirtingos ragenos stromos morfologijos viršutiniai sluoksniai absorbuoja mažiau vandens nei gilieji stromos sluoksniai [46, 47].

Iš vidinės pusės rageną saugo *Descemeto membrana*. Prie šios membranos tvirtinasi *endotelis* – heksagoniškai išsidėsčiusių ląstelių sluoksnis, kurio pagrindinė funkcija – neleisti intraokuliniam skysčiui iš priekinės kameros prasiskverbti į rageną [39, 43].

Operacijos metu arba netyčia pažeidus vieną arba kelis ragenos sluoksnius, pakinta skysčių balansas, rageną tinsta ir praranda skaidrumą [45, 48]. Ragenos gijimo greitis ir tipas priklauso nuo to, kuris ragenos sluoksnis pažeistas, koks žaizdos gylis, ar nėra infekcijos sukėlėjų, ar naudojami vaistai. Refrakcinės chirurgijos požiūriu svarbiausi gijimo procesai – epitelio ląstelių atsinaujinimas bei ragenos stromos gijimas.

Ragenos epitelio sluoksnio atsinaujinimas vyksta ląstelėms dalijantis bei migruojant iš periferinės zonos į ragenos centrą [49]. Epitelio migracijos greitis yra 60–70 $\mu\text{m}/\text{h}$ [50], todėl, priklausomai nuo pažeidimo dydžio, epitelio atsinaujinimas gali trukti nuo kelių valandų iki keleto dienų.

Ragenos stroma gyja žymiai lėčiau. Pažeistoje ragenos stromoje aktyvuojamos už gijimo procesą atsakingos ląstelės – keratocitai [49, 51–53]. Jos gamina kolageną ir taiso audinio defektus. Tačiau šis naujai sukurtas kolagenas (IV ir VII tipo) savo sandara skiriasi nuo įprastai ragenoje esančio kolageno (I ir III tipo), todėl žaizdos vietoje formuojasi neskaidrus randas, dar vadinamas drumstimi arba subepiteline migla [54]. Vėliau šis naujas audinys pamažu keičiamas ir ragenos skaidrumas didėja [43, 55].

1.2 Lazerinės refrakcinės chirurgijos procedūros

Refrakcinių ydų korekcijos principas gana paprastas – reikia tinkamai pakeisti ragenos gaubtumą preciziškai pašalinant minimalų ragenos kiekį ir taip pakeičiant akies laužiamąją gebą. Šiam tikslui puikiai tinka lazeriniai impulsai. Lazerinės refrakcinės chirurgijos pradžia laikoma 1983 m., kai pirmą kartą S. L. Trockel su bendraautoriais paskelbė apie sėkmingą *ex vivo* veršiuko ragenos paviršiaus modifikavimą eksimerinio ArF lazerio

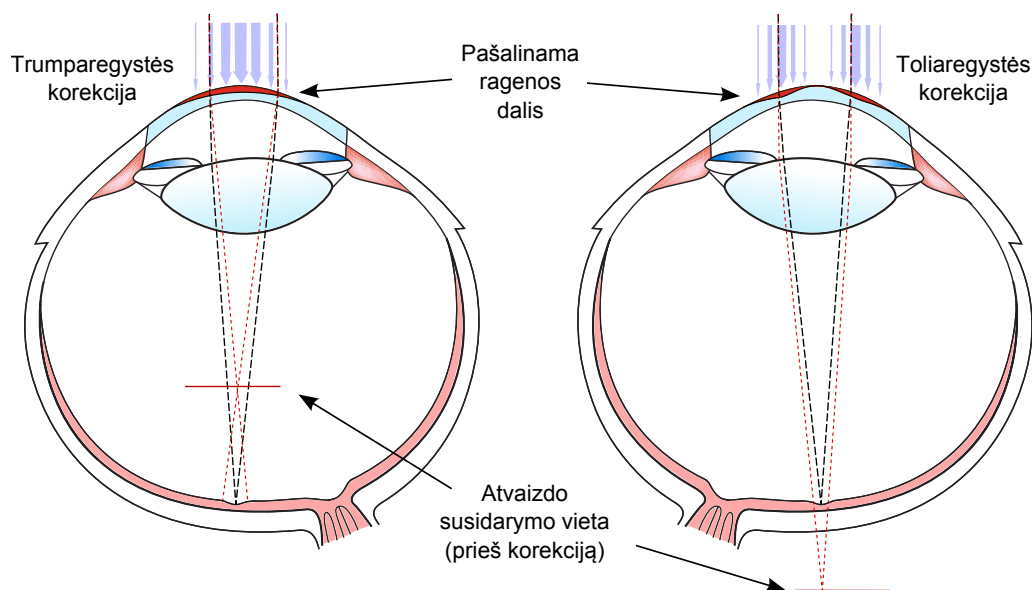
193 nm spinduliuote [56]. 1989 m. buvo atlikti pirmieji kontroliuojami kliniškai tyrimai [35] ir iki šių dienų ArF lazerio impulsai sėkmingai naudojami trumparegystės, toliaregystės bei astigmatizmo korekcijai.

Nors šiandieninėje oftalmologijoje yra daugybė skirtingų lazerinių refrakcinių ydų korekcijos procedūrų, iš esmės beveik visos jos pagrįstos tik dviem skirtingais lazerinės spinduliuotės ir audinio sąveikos mechanizmais. Pirmasis – lazerinė abliacija. Tai yra tikslus audinio paviršiaus garinimas nanosekundiniais arba trumpesniais UV impulsais, nesukeliant šiluminių pažeidimų gretimose audinio zonose. Antrasis – fotoardymas. Tai yra į mikrometrų dydžio dėmę sufokusuotais aIR ultratrumpaisiais impulsais ($\tau < 1$ ps) audinio tūryje formuojamų lokalių mikropažeidimų sukūrimas. Šiuos du sąveikos mechanizmus naudojant atskirai arba derinant kartu buvo sukurta nemažai oftalmologinių procedūrų. Keletą iš jų trumpai aptarsime.

Fotorefrakcinė keratektomija (FRK) – tai pirmoji lazerinė refrakcinių ydų korekcijos procedūra, kurios pagrindu vėliau buvo vystomi pažangesni regos korekcijos metodai. Prieš FRK procedūrą mechaniškai arba praskiestu alkoholiu pašalinamas ragenos epitelis, o po to lazeriu atliekama labai tiksliai ragenos stromos abliacija. FRK procedūros metu nanosekundiniais UV impulsais (193–213 nm) kelių šimtų nanometrų tikslumu pašalinami ragenos stromos audinio sluoksniai ir pakeičiamas ragenos kreivumo spindulys. Operuojant trumparegę akį, daugiau audinio pašalinama optinės zonos centre, ragena suplokštėja, o toliaregę – periferijoje, ragena tampa išgaubtesnė (1.3 pav.). Varijuojant gaubtumą skirtinguose ragenos meridianuose, galima ištaisyti ir astigmatizmą. Didžiausias diskomfortas po FRK procedūros jaučiamas porą dienų, kol visiškai atauga ragenos epitelis. Ataugęs epitelis užlygina operacijos metu ragenos stromos paviršiuje suformuotus mikrometrų dydžio netolygumus bei sugrąžina akies paviršiui optinę kokybę. Lyginant su modernesnėmis refrakcinėmis procedūromis, po FRK procedūros dėl pažeisto epitelio jaučiamas didesnis pooperacinis skausmas, atliekant didesnių ydų (virš 6 D) korekciją dažniau atsiranda subepitelinė migla (ragenos drumstumas), ji būna intensyvesnė, dažniau pasireiškia regos regresija [57, 58].

Norint išvengti minėtų FRK procedūros trūkumų, buvo sukurtas naujas metodas, leidžiantis modifikuoti ne viršutinį ragenos paviršių, o vidinius stromos sluoksnius, taip minimaliai pažeidžiant ragenos epitelį. Šiuo principu paremta, pati populiariausia refrakcinės chirurgijos procedūra – *lazerinė in situ keratomilezė* (LASIK) [15]. 1990 m. pirmasis LASIK terminą pavartojo L. G. Pallikaris kartu su bendraautoriais paskelbęs apie sėkmingai

1. Lazerinė refrakcinė chirurgija



1.3 pav. Fotorefrakcinės keratektomijos procedūra. Kairėje pavaizduota trumparegystės, o dešinėje – toliaregystės korekcijos principas.

atliktą operaciją triušiams [59]. Pirmieji LASIK procedūrą žmonėms atliko L. Buratto ir M. Ferrari 1992 m. [60]. Šios procedūros pradžioje mikrokeratomu (deimantiniu peiliuku) atpjaunamas 100–200 μm storio ragenos lopas (visas ragenos storis $\sim 500 \mu\text{m}$). Pakėlus ragenos lopą atliekamas antrasis LASIK procedūros etapas, analogiškas FRK procedūrai – nanosekundiniais UV impulsais atliekama stromos abliacija, po kurios lopas užklojamas atgal. Gražintas lopas prikimba dėl adhezijos, o lopo kraštas per keletą dienų prisitvirtina dėl gana greitai atsinaujinančių epitelio ląstelių migracijos.

Lyginant su FRK, LASIK metodu galima koreguoti didesnes refrakcijos ydas, po procedūros akis gyja greičiau ir ne taip skausmingai, mažiau drumsčiasi ragena [57, 58, 61, 62]. Kadangi mikrokeratomas valdomas rankomis, rezultatai priklauso nuo chirurgo kvalifikacijos ir kruopštumo, išlieka žmogiškosios klaidos tikimybė. Dažniausiai komplikacijos susijusios būtent su ragenos lopo atpjovimu, t. y. lopas gali būti netolygus, nevisiškai atpjautas, su skylė arba visiškai nupjautas nepaliekant vyrio [20].

Dar viena refrakcinė procedūra atsirado 1996 m. [63], kaip tarpinis variantas tarp FRK ir LASIK. Tai *lazerinė subepitelinė keratektomija* (LASEK). Jos metu praskiestu alkoholiu atskiriamas ragenos epitelis nuo bazinės membranos, tada atliekama analogiška FRK procedūra, o pabaigoje epitelis gražinamas atgal [63, 64]. Nors vėliau atsirado ir daugiau šios procedūros modifikacijų (epi-LASEK, epi-LASIK), dėl ilgesnio pooperacinio gijimo ir didesnio skausmo [65] ši operacija dabar taikoma retai.

1994 m. W. Kautek tyrimų grupė pabandė pirmą kartą pritaikyti femto-

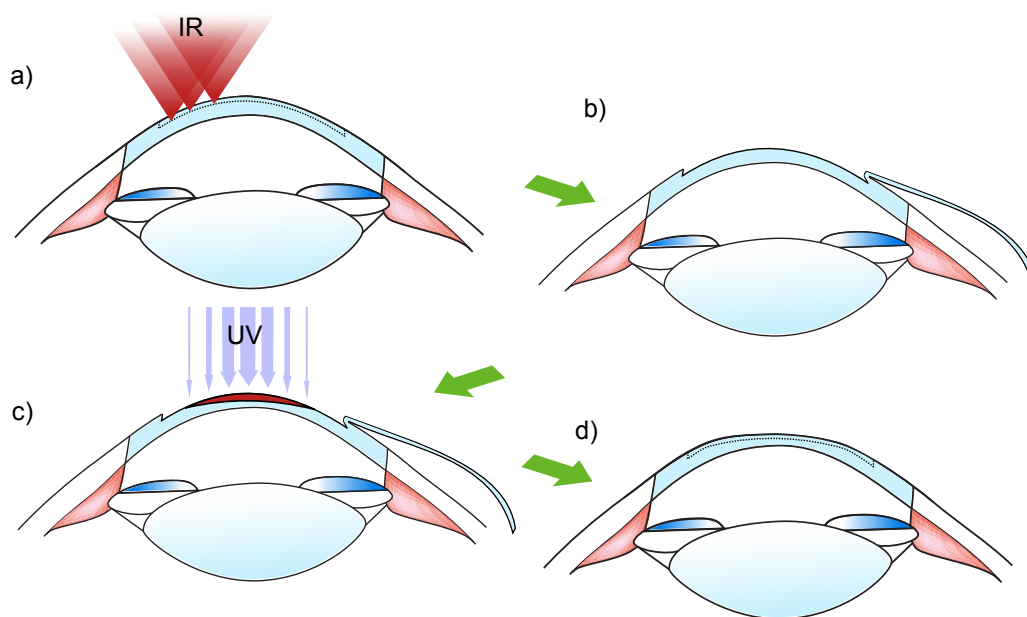
sekundinius regimojo diapazono impulsus ragenos paviršiaus abliacijai [66], tačiau rezultatai didelės praktinės naudos nedavė. Dėl netiesinės sąveikos prigimties ragenos abliacijos greitis smarkiai priklausė nuo vandens kiekio ragenoje. Todėl abliacijos procesas buvo sunkiai nuspėjamas. Geresnių rezultatų pavyko pasiekti kitai su femtosekundiniais lazeriais dirbančiai mokslininkų grupei. 1996 m. T. Juhasz su bendraautoriais atliko fotoardymo proceso tyrimą [67]. Jie pademonstravo, kad sufokusavus 620 nm bangos ilgio 150 fs trukmės impulsus ragenoje, fotoardymo būdu yra sukuriamas lokalus pažeidimas, kurio netiesioginis poveikis dėl smūginių bangų ir kavitacijos¹ efekto gretimoms audiniams yra žymiai mažesnis nei pikosekundinių ar nanosekundinių impulsų atveju. Dėl šios savybės T. Juhasz prognozavo, jog femtosekundiniai lazeriai gali būti pritaikyti įvairioms refrakcinėms procedūroms ir savo galimybėmis gali pralenkti iki tol naudotas kitas mechanines ir lazerines sistemas bei technologijas [68].

Ilgai laukti nereikėjo – aIR srities femtosekundiniai impulsai 2001 m. buvo pritaikyti LASIK ragenos lopo pjovimui [17]. Nauja technologija leido formuoti tolygaus storio, taisyklingos bei individualiai kiekvienam pacientui pritaikomos geometrijos ragenos lopus [19,69]. Femto-LASIK procedūros eiga, kai ragenos lopo formavimui naudojamas femtosekundinis lazeris, pavaizduota 1.4 pav. Apie 300–500 fs trukmės ir apytiksliai 1000 nm bangos ilgio sufokusuotu impulsu sąsmaukoje sukuriamas burbuliuko pavidalo kelių mikrometrų dydžio pažeidimas. Skenuojant sufokusuotą impulsinį aIR lazerio pluoštą ragenos tūryje formuojamas ištisinis burbuliukų sluoksnis (1.4 pav., a). Taip suformuojamas ragenos lopus bei atpjaunamas lopo kraštai, paliekant kelių milimetrų pločio vyrį. Chirurgine mentele ragenos lopus mechaniškai atkeliamas (1.4 pav., b). Tada naudojant antrojo, nanosekundinio UV lazerio spinduliuotę, suformuojamas norimas laužiamosios gebos pokytis (1.4 pav., c) ir ragenos lopus gražinamas atgal (1.4 pav., d).

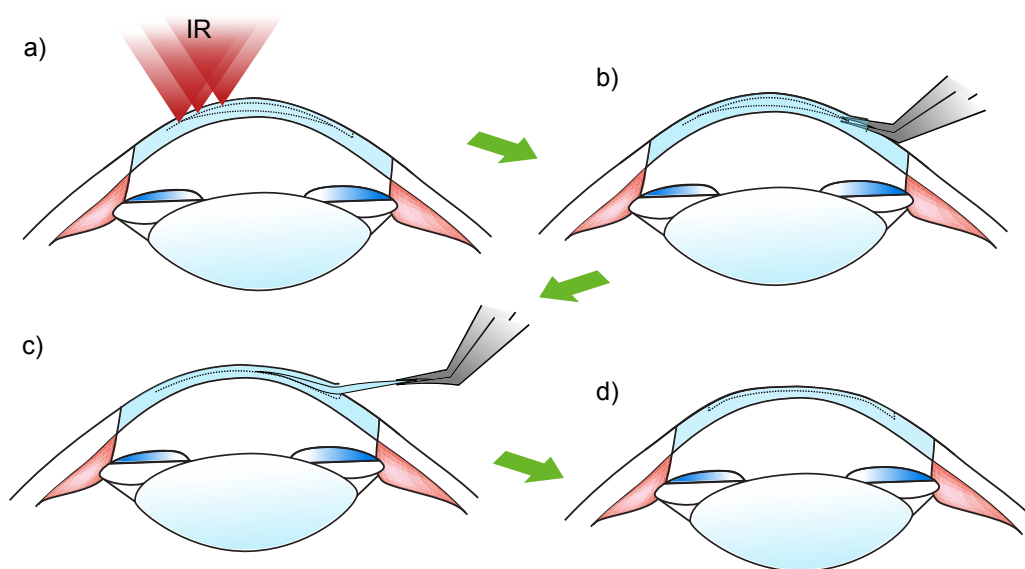
Atsiradus pirmiesiems refrakcinei chirurgijai pritaikytiems komerciniams femtosekundiniams lazeriams, LASIK procedūra dar labiau išpopuliarėjo. Dėl taisyklingesnės, individualiai pacientui pritaikytos lopo geometrijos bei kontroliuojamo lopo storio sumažėjo komplikacijų rizika [19,20]. Pagrindiniai femtosekundinės LASIK procedūros trūkumai susiję su tuo, kad naudojamos dvi lazerinės sistemos: brangiai kainuojanti įranga lemia didelę procedūros kainą, dviem lazerinėms sistemoms reikia didesnės operacinės patalpos, procedūros metu pacientą reikia perkelti nuo vienos sistemos prie

¹Kavitacija – [lot. *cavitas* – tuštuma], garų ar dujų burbuliukų susidarymas skystyje

1. Lazerinė refrakcinė chirurgija



1.4 pav. Femto-LASIK procedūra: a) ragenos lopo formavimas femtosekundiniais aIR impulsais; b) suformuoto lopo atvertimas; c) ragenos stromos abliacija UV impulsais; d) lopo užvertimas.



1.5 pav. SMILE procedūra: femtosekundiniais aIR impulsais ragenoje išpjaunamas lęšiukas (a), kuris pincetu ištraukiamas pro siaurą įpjovą (b ir c). Po procedūros ragena tampa plokštesnė (d).

kitos. Dėl šių priežasčių buvo ieškoma būdų, kaip vienu femtosekundiniu lazeriu (nenaudojant UV spinduliuotės ragenos abliacijai) atlikti pilną refrakcijos korekcijos procedūrą [19, 68, 70].

2008 m. W. Sekundo su bendraautoriais paskelbė apie sėkmingai atliktą trumparegystės korekciją naudojant femtosekundinę lazerinę sistemą „Visu-

1.3. Šiuolaikinės lazerinės sistemos refrakcinei chirurgijai

Max“ („Carl Zeiss Meditec“, Vokietija) [71]. Panašiai kaip LASIK lopo pjovimo procedūroje, femtosekundiniais impulsais ragenos tūryje atidalinamas tam tikrą laužiamosios gebos pokytį atitinkantis stromos sluoksnis. Atvertus lopa, šis sluoksnis pašalinamas, o atgal užklotas ragenos lopus grąžina akies paviršiui optinę kokybę. Ši procedūra buvo pavadinta FLEx (angl. *Femtosecond Lenticule Extraction*). Vėliau buvo sukurta mažiau invazinė SmILE (angl. *Small Incision Lenticule Extraction*) procedūra [72], kurios principinė schema pavaizduota 1.5 pav. Didžiausias šios procedūros privalumas – nereikia atversti ragenos lopo. Femtosekundiniais impulsais suformuotas lęšio pavidalo ragenos sluoksnis (1.5 pav., a) ištraukiamas pro kelių milimetrų pločio įpjovą (1.5 pav., b ir c), taip modifikuojant ragenos laužiamąją gebą bei minimaliai pažeidžiant epitelį. Tačiau vien tik femtosekundinį lazerį turinti sistema kol kas negali atlikti visų standartinių refrakcinių procedūrų. Pagrindinis trūkumas – nepavyksta patikimai atlikti toliaregystės korekcijos [73]. Be to, šios sistemos netinka mažų refrakcijos ydų korekcijoms bei pakartotinėms operacijoms [74], nes nėra lengva suformuoti ir patikimai pašalinti labai ploną ragenos sluoksnį.

1.3 Šiuolaikinės lazerinės sistemos refrakcinei chirurgijai

1.3.1 Femtosekundinės aIR lazerinės sistemos

Pradėjus taikyti infraraudonosios srities femtosekundinių lazerių impulsus biologinių audinių fotoardymui, prasidėjo ir nauja era oftalmologijos istorijoje. Nors femtosekundiniai lazeriai oftalmologijoje pradėti naudoti tik 2001 m. [17], tačiau jau dabar sukurta daugybė procedūrų, kuriose ultratrumpieji impulsai atlieka skalpelio vaidmenį. Preciziškai tikslūs lazeriniai pjūviai ir minimalus šalutinis poveikis gretimiems audiniams šiandien leidžia femtosekundiniais aIR impulsais ne tik atidalinti ragenos lopa LASIK procedūros metu, bet ir nenaudojant nanosekundinių UV impulsų tiksliai koreguoti trumparegystę [71, 75, 76], astigmatizmą [72], presbiopiją [77], paruošti donoro ir recipiento ragenas keratoplastikos procedūrai [78]. Dar viena oftalmologijos šaka, kurioje femtosekundiniai lazeriai sukėlė revoliuciją – kataraktos chirurgija. Praeito dešimtmečio pabaigoje buvo pademonstruota, jog kataraktos šalinimo operacijoje vienu femtosekundiniu lazeriu galima atlikti kapsulotomiją, lęšiuko branduolio fragmentaciją ir ragenos pjūvius [79, 80].

Pirmoji komercinė refrakcinei chirurgijai skirta femtosekundinė lazerinė sistema pasirodė 2001 metais („Intralase Femtosecond Laser“, „Abbott

1. Lazerinė refrakcinė chirurgija

Medical Optics“, JAV) [17]. Šiuo metu refrakcinės chirurgijos rinkoje galima rasti penkias femtosekundines lazerines sistemas: „Intralase iFS“ („Abbott Medical Optics“, JAV), „Visumax“ („Carl Zeiss Meditec“, Vokietija), „Femtec“ („Technolas Perfect Vision“, Vokietija), „Ziemer LDV“ („Ziemer Ophthalmic Systems“, Šveicarija) ir „WaveLight FS200“ („Alcon“, Šveicarija) [81]. Šių femtosekundinių sistemų pagrindiniai parametrai pateikiami 1.1 lentelėje.

Siekiant sukurti pigesnę ragenos lopo formavimo lazerinę sistemą, jau porą metų vietoj aIR srities femtosekundinių impulsų bandoma pritaikyti nanosekundinę UV spinduliuotę, kurios bangos ilgis dar nėra tiesiškai sugeriamas ragenoje $\lambda \approx 355$ nm [82, 83]. UV impulsai ragenos lopo pjovimui pasirinkti neatsitiktinai – kaip žinoma, sufokusuoto pluošto sąsmaukos skersmuo ir ilgis yra tiesiogiai proporcingi fokusuojamos spinduliuotės bangos ilgiui. Todėl, vietoj aIR impulsų naudojant trumpesnio bangos ilgio UV impulsus, lazerio pluoštą galima sufokusuoti į mažesnę dėmę ir kartu pagerinti audinio pjovimo tikslumą. Tačiau UV impulsų pritaikymas ragenos lopo pjovimui klinikiu požiūriu dar nėra patvirtintas. Nėra iširta, kokią įtaką 355 nm UV impulsai daro žmogaus ragenos gijimui po operacijos ir kokį poveikį šis bangos ilgis gali daryti akies lęšiukui bei tinklainei.

2014 m. D. R. Brooks su bendraautorais pristatė dar vieną prototipinę femtosekundinę lazerinę sistemą akių chirurgijai [84]. Ši ragenos apdirbimui skirta lazerinė sistema 8 mm zonoje kartu su lazeriniu pluoštu skenuoja ir

1.1 lentelė Šiuolaikinių komercinių ragenos lopo atidalinimui skirtų femtosekundinių lazerinių sistemų pagrindiniai parametrai.

	Intralase iFs	Visumax	Femtec	Ziemer LDV	WaveLight FS200
Dažnis (kHz)	150	500	80	>1000	200
Impulso trukmė (fs)	>500	400	>500	200–300	350
Bangos ilgis (nm)	1053	1043	1052	~ 1050	
Atstumas tarp dėmių (μm)	1–5	1	>1	<2	5
Impulso energija (μJ)	0,5–1,3	<0,3	>0,5	<0,1	0,3–1,5
Prisiurbimo paviršius	plokščias	gaubtas	gaubtas	plokščias	plokščias

didelės skaitinės apertūros fokusuojantį lęšį ($NA = 1,0$). D. E. Savage ir bendraautoriai pademonstravo, kad naudojant šią sistemą *in vivo* katės ragenoje femtosekundiniais 400 nm bangos ilgio impulsais be invazijos galima suformuoti refrakcines struktūras, išliekančias bent 12 mėnesių po procedūros [85].

1.3.2 Lazerinės sistemos ragenos stromos abliacijai

Tam, kad abliacijos procesas vyktų efektyviai ir nuspėjamai, lazerio spinduliuotė turi būti efektyviai sugerama audinio paviršiuje. Ragenos stromos sugertis smarkiai išauga tolimajame UV spinduliuotės diapazone, todėl nanosekundiniais arba trumpesniais šviesos impulsais galima šalinti paviršinių ragenos sluoksnį bei koreguoti akies laužiamąją gebą. Kai spinduliuotės bangos ilgis yra tarp 190 nm ir 220 nm, ragenos stromos abliacijos procesą apibūdinantys parametrai (abliacijos slenkstinis intensyvumas, abliacijos sparta bei netiesioginis šiluminis poveikis gretimiems audiniams) iš esmės nesiskiria [86].

Pirmasis FRK procedūroms buvo pritaikytas eksimerinis ArF lazeris, kurio bangos ilgis yra 193 nm. Didžiausias šio lazerio privalumas – UV spinduliuotė gaunama tiesiogiai, nenaudojant netiesinių dažnio keitiklių. Tačiau eksimeriniai ArF lazeriai turi ir nemažai trūkumų. Šie lazeriai nepasižymi gera pluošto kokybe ir didelė dalis sugeneruotos spinduliuotės prarandama formuojant abliacijai tinkamą pluošto profilį. Taip pat eksimerinių lazerių stabilumas nėra pakankamai geras: lazerio impulsų energija turi būti tikrinama kelis kartus per dieną, o naudojant senesnes eksimerines sistemas kalibravimo procedūra privalo būti atliekama prieš kiekvieną operaciją. Šie lazeriai reikalauja dažnos techninės priežiūros, nes aktyviąją lazerio medžiagą periodiškai reikia papildyti F_2 dujomis, kurios yra nuodingos. Taip pat ArF eksimeriniai lazeriai yra gana jautrūs aplinkos parametrams, todėl operacinėje patalpoje turi būti užtikrinta stabili oro temperatūra bei drėgmė.

Ilgainiui eksimerinės ArF sistemos buvo smarkiai ištobulintos. Pirmosiose eksimerinėse sistemose refrakcijos pokyčio formavimui lazerinis pluoštas buvo apribojamas naudojant keičiamo skersmens diafragmų sistemas [87] arba siaurus besisukančius plyšius [88]. Vienu impulsu būdavo paveikiama didelė ragenos zona, o tai riboja abliacijos skiriamąją gebą. Šiuolaikinių eksimerinių lazerių pluoštas valdomas greitais galvanometriniiais veidrodėlių skeneriais, pluošto skersmuo ties abliuojamu paviršiumi yra pakankamai mažas (0,5–2 mm), todėl galima koreguoti ne tik sferines bet ir aukštesnių eilių refrakcines ydas. Šiandien moderniausių eksimerinių lazerinių sistemų

1. Lazerinė refrakcinė chirurgija

impulsų pasikartojimo dažnis siekia ~ 1 kHz [89,90], kai pirmosios sistemos veikė vos kelių dešimčių hercų pasikartojimo dažniu. Dėl to FRK procedūros trukmė gerokai sutrumpėjo, o kartu sumažėjo su operacijos trukme siejama rizika – netiksli korekcija dėl ragenos stromos paviršiaus dehidratacijos ar nevalingų akies judesių [91].

Keičiantis lazerinių sistemų spinduliuotės parametrams, keitėsi ir refrakcinių ydų korekcijų algoritmai. Pavyzdžiui, naujausios kartos „Schwind eye-tech-solutions“ firmos „Amaris“ lazerinės sistemos turi du abliacijos režimus: pradžioje ragena abliuojama greitai didelio energijos tankio impulsais (450 mJ/cm^2), o procedūra pabaigiama mažo energijos tankio (160 mJ/cm^2) impulsais – lėtai, bet su didesne gylio skyra, tiksliai suformuojamas galutinis erdvinis darinys [92]. Šiuo būdu išlaikoma trumpa procedūros trukmė bei didelis abliacijos tikslumas. Dar vienas šio metodo privalumas – mažesni formuojamo paviršiaus iškraipymai dėl eksimerinio lazerio impulsų galios nestabilumo laike bei abliuojančio pluošto kokybės. Didžiąją procedūros dalį ragena šalinama didelio energijos tankio impulsais, kai abliacijos gylis yra ribojamas dėl plazmos formavimosi ir išaugusios sugerties ragenos paviršiuje [93]. Taip pat visos šiuolaikinės eksimerinės sistemos turi integruotus akies judesių sekimo modulius ir pagal akies poziciją koreguoja galvanometriniais veidrodėlių skeneriais valdomo lazerinio pluošto padėtį. Didžiausias dažnis, kuriuo šiuolaikinėse lazerinėse sistemose sekami akies judesiai, yra 1050 Hz.

Nors per daugiau kaip 30 metų nuo pirmųjų bandymų modifikuoti ragenos paviršių lazerio impulsais eksimerinės ArF lazerinės sistemos buvo smarkiai išstobulintos, jau 25 metus ieškoma alternatyvų šiam lazeriui pakeisti [94]. Lyginant su ArF lazeriu, kietakūnės lazerinės sistemos pasižymi dideliu impulsų laikiniu stabilumu, žymiai geresne pluošto kokybe bei reikalauja mažiau techninės priežiūros. Tačiau didžioji dalis kietakūnių lazerių šviečia aIR diapazone ir jų fundamentinė spinduliuotė netinka ragenos abliavimui.

Efektyvus būdas UV spinduliuotei gauti yra kietakūnių lazerių (dažniausiai veikiančių neodimio jonų pagrindu) harmonikų generacija. Gana nesunkiai ir efektyviai gaunama ketvirtoji šių lazerių spinduliuotės harmonika (266 nm) negali būti naudojama FRK dėl mažiausiai dviejų priežasčių: 1) šio bangos ilgio sugertis ragenoje yra kur kas silpnesnė nei ~ 200 nm spinduliuotės, dėl to abliacijos kokybė ir efektyvumas smarkiai krinta [86]; 2) 266 nm spinduliuotė pasižymi dideliu mutageniniu poveikiu dėl to, kad ją stipriai sugeria deoksiribonukleorūgštis (DNR) [37]. Tačiau šių problemų

1.4. Lazerinės spinduliuotės ir biologinių audinių sąveika

galima išvengti generuojant penktąją neodimio lazerių harmoniką (213 nm). Tyrimai parodė, kad nanosekundinę 210–213 nm spinduliuotę galima efektyviai taikyti ragenos abliacijai [30,31,34,94,95], o jos mutageninis poveikis neviršija eksimerinio lazerio spinduliuotės poveikio [37]. Taip pat buvo mėginama pritaikyti ir kietakūnį erbio jonų pagrindu veikiančią lazerį generuojant aštuntąją jo spinduliuotės harmoniką (193 nm) [96], tačiau publikacijų apie tolimesnius šio gana komplikoto metodo tyrimus rasti nepavyko.

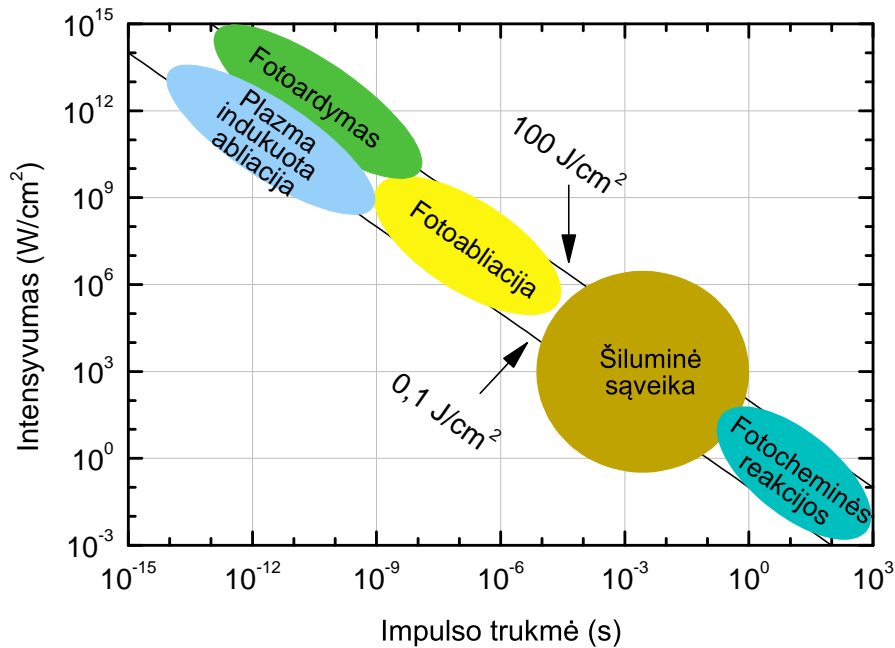
Šiame darbe ragenos stromos abliacijai naudojami kietakūnio Yb:KGW femtosekundinio lazerio penktosios harmonikos (205 nm) impulsai. Lyginant su kitomis refrakcinėje chirurgijoje naudojamomis lazerinėmis sistemomis, mūsų naudotos sistemos bangos ilgis (205 nm) yra tarp kietakūnių (210–213 nm) ir eksimerinių ArF lazerių (193 nm), todėl ragenos stromos abliacijos efektyvumas dėl didelės sugerties šiame UV diapazone iš principo neturėtų skirtis [86].

1.4 Lazerinės spinduliuotės ir biologinių audinių sąveika

Lazerinės spinduliuotės sąveikos su medžiaga pobūdį lemia medžiagos charakteristikos ir lazerio spinduliuotės parametrai. Skirtingos medžiagos skirtingai atspindi, sugeria ir sklaido šviesą, taip pat turi tam tikrą savitąją šiluminę talpą bei laidumą, skirtingas mechanines savybes. Atspindžio, sugerties ir sklaidos koeficientai savo ruožtu priklauso nuo spinduliuotės bangos ilgio ir intensyvumo. Negana to, bendras spinduliuotės poveikio rezultatas irgi priklauso nuo ekspozicijos trukmės ir impulsų energijos tankio. Todėl natūralu, kad egzistuoja daug skirtingų spinduliuotės ir medžiagos sąveikos rūšių. Pagrindiniai procesai, kurie vyksta lazerine spinduliuote veikiant biologinius audinius, gali būti suskirstyti į 1) fotochemines reakcijas, 2) šiluminę sąveiką, 3) fotoabliaciją, 4) plazma indukuota abliaciją ir 5) fotoardymą [38]. Šių sąveikos rūšių apytikslis klasifikavimas pagal lazerinės spinduliuotės parametrus pateikiamas 1.6 pav. Spinduliuotės sąveikos su biologiniais audiniais tipai ne visada gali būti tiksliai atskiriami, todėl vienu metu dažniausiai pasireiškia kelios sąveikų rūšys. Lazerinės refrakcinės chirurgijos procedūros iš esmės paremtos dviem sąveikos tipais – fotoardymu ir fotoabliacija, todėl juos plačiau ir aptarsiu.

1.4.1 Fotoardymas

Fotoardymas – tai spinduliuotės ir medžiagos sąveikos mechanizmas, kuriuo paremta daugybė oftalmologinių procedūrų: LASIK ragenos lopo



1.6 pav. Lazerinės spinduliuotės poveikio biologiniams audiniams apytikslis klasifikavimas pagal spinduliuotės intensyvumą ir impulso trukmę. Ištisinėmis linijomis žymima medicininiam taikymams naudojamų lazerių spinduliuotės ribinės energijos tankio vertės. Adaptuota iš [38, 81].

formavimas, intrastrominiai pjūviai, ragenos transplantavimas, kataraktos operacijos. Kai medžiagą veikia intensyvus ultratrumpasis impulsas, skaidrijoje terpėje dėl daugiafotonės ir griūtinės jonizacijos gali susidaryti plazma. Todėl smarkiai padidėja lazerio spinduliuotės sugertis ir įvyksta fotoardymo procesas.

Tam, kad medžiagoje susidarytų plazma ir įvyktų optinis pramušimas, laisvųjų elektronų tankis turi pasiekti tam tikrą kritinę vertę. Pavyzdžiui, fokusuojant femtosekundinius aIR srities impulsus distiliuotame vandenyje optinis pramušimas įvyksta tada, kai laisvųjų elektronų tankis yra $N_{sl} \approx 10^{21} \text{ cm}^{-3}$, o nanosekundiniams impulsams ši vertė yra $N_{sl} \approx 10^{20} \text{ cm}^{-3}$ [97]. Paprastai visose medžiagose yra tam tikras nedidelis laisvųjų elektronų kiekis. Jeigu skaidri medžiaga veikiama ultratrumpuoju impulsu, laisvieji elektronai gali būti sukurti dėl daugiafotonės jonizacijos (DFJ). Daugiafotonės jonizacijos sparta W_{DFJ} išreiškiama kaip intensyvumo funkcija:

$$W_{DFJ} = \sigma_K I^K, \quad (1.1)$$

čia σ_K – daugiafotonės jonizacijos koeficientas, I – spinduliuotės intensyvumas, K – mažiausia įmanoma netiesinės sugerties eilė, kai K fotonų suminė energija yra lygi arba viršija draustinės energijos tarpą E_g :

$$Kh\nu \geq E_g. \quad (1.2)$$

Kitas būdas sugeneruoti laisvuosius elektronus yra smūginė jonizacija. Medžiagą veikiant lazerio spinduliuote, laisvieji elektronai įgauna energijos ir yra įgreitinami. Pakankamai įgreitinti elektronai gali išlaisvinti surištuosius elektronus perduodami savo energiją per smūginę jonizaciją. Taip laisvųjų elektronų kiekis vis didėja – vyksta griūtinė jonizacija. Dalis laisvojo elektrono energijos gali būti panaudota lokaliai medžiagos šildymui.

Kai skaidrią medžiagą veikia 10 fs–10 ps trukmės impulsai, kritinė laisvųjų elektronų tankio vertė pasiekama veikiant abiem daugiafotonės ir griūtinės jonizacijos procesams kartu. Šiuo atveju laisvųjų elektronų tankio N^e kitimas aprašomas tokia lygtimi:

$$\frac{dN^e}{dt} = W_{DFJ}N^e + \eta N^e - aN^e. \quad (1.3)$$

Čia η yra griūtinės jonizacijos sparta, a – laisvųjų elektronų rekombinacijos sparta. Paprastai griūtinės jonizacijos sparta η yra tiesinė intensyvumo funkcija. Kai lazerio impulsai yra trumpesni nei 1 ps, rekombinaciją aprašanti paskutinįjį (1.3) lygties narį galima atmesti, nes impulsas per trumpas ir elektronai rekombinuoti nespėja. Esant itin trumpiems impulsams $\tau < 10$ fs, kritinė elektronų tankio vertė gali būti pasiekta vien tik dėl daugiafotonės jonizacijos. Jeigu intensyvaus ultratrumpojo impulso pradžioje sugeneruojama pakankamai laisvųjų elektronų ir susiformuoja plazma, tai likusiai impulso daliai sugertis smarkiai išauga. Sugeriamą likusios impulso dalies energija kaitina plazmą, ir kadangi sukurtas šilumos kiekis iš pluošto sąsmaukos nespėja difunduoti, dėl didelio slėgio ir temperatūros gradiento susidaro smūginė banga. Smarkiai išaugus temperatūrai, sukuriama lokalūs įtempimai ir dėl mechaninių jėgų audinys suardomas, susiformuoja burbuliuko pavidalo tuštuma. Kaip parodė masių spektroskopinė analizė, po fotoardymo proceso ragenoje susidariusio burbuliuko viduje lieka CO, CO₂, CH₄ garų mišinys, su CH₃ ir CH₂ fragmentais [98]. Šios molekulės lengvai difunduoja į ragenos stromą, todėl per kelias minutes burbuliukai dingsta [99].

Kai audiniai veikiami didelės energijos nanosekundiniais ar pikosekundiniais impulsais, fotoardymo procesas vyksta dėl mechaninių jėgų poveikio. Kadangi plazmos elektronų kinetinė energija labai didelė, elektronai nebėra lokalizuoti vien plazmos tūryje – jie gali difunduoti į aplinkinę medžiagą. Kuo impulsas ilgesnis, tuo toliau nuo pluošto sąsmaukos nudifunduoja elekt-

1. Lazerinė refrakcinė chirurgija

ronai ir tuo didesnė impulso energijos dalis panaudojama audinio šildymui.

Jeigu impulsai labai trumpi (kelių šimtų femtosekundžių), tai fotoardymui reikiamam spinduliuotės intensyvumui pasiekti pakanka žymiai mažesnės energijos nei naudojant pikosekundinius ar nanosekundinius impulsus, todėl ir mechaniniai efektai gretimoms medžiagos zonoms pasireiškia žymiai silpniau. Todėl naudojant femtosekundinius impulsus minkštuosiuose audiniuose galima suformuoti kelių mikrometrų dydžio burbuliuko pavidalo lokalius pažeidimus nesukeliant žymaus mechaninio ar šiluminio poveikio gretimoms audiniams [38].

Norint preciziškai pjauti audinius, reikia impulso energiją kuo labiau koncentruoti erdvėje: trumpinti impulso trukmę bei fokusuoti lazerio pluoštą į kuo mažesnę dėmę. Kuo impulsas trumpesnis, tuo jo intensyvumas didesnis, todėl trumpesniems impulsams slenkstinė optinio pramušimo intensyvumo vertė pasiekama esant mažesnei impulso energijai. Ragenos lopo pjovimui LASIK procedūros metu paprastai naudojama apie 200–800 fs trukmės, 300–1500 nJ energijos impulsai, kurių bangos ilgis apie 1 μm . Trumpesnius nei 200 fs impulsus naudoti ragenos pjovimui pasidaro nebepraktiška. Kuo trumpesnis impulsas, tuo platesnis jo spektras ir tuo smarkiau pasireiškia dispersinis impulso plitimas jam sklindant skaidrioje terpėje (pvz. ragenoje).

Kitas būdas sumažinti fotoardymo procesui reikiamos impulso energijos slenkstį – sumažinti fokusavimo dėmę bei pluošto sąsmaukos ilgį. Mažiausias pluošto sąsmaukos dydis, kuris gali būti pasiekiamas fokusuojant lęšiu (objektyvu), priklauso nuo optinės sistemos židinio nuotolio ir jos apertūros, t. y. skaitinės apertūros (NA). Optinės sistemos skaitinė apertūra apibrėžiama taip:

$$NA = n \sin(\theta/2), \quad (1.4)$$

čia n – medžiagos, kurioje fokusuojamas pluoštas, lūžio rodiklis, θ – didžiausias iš lęšio galinčio išeiti (arba į lęšį įeiti) šviesos kūgio kampas.

Jeigu lęšiu fokusuojamas kolimuotas Gauso pluoštas, tai lęšio židinyje pluošto sąsmaukos spindulys išreiškiamas pagal formulę:

$$w_F = \frac{\lambda F M^2}{\pi w_L}, \quad (1.5)$$

čia λ – spinduliuotės bangos ilgis, F – lęšio židinio nuotolis, M^2 – pluošto kokybę nusakantis parametras, kuris idealiam Gauso pluoštui lygus 1, w_L – kolimuoto pluošto spindulys ties lęšiu [100]. Kitas svarbus parametras,

nusakantis sufokusuoto pluošto sąsmaukos ilgį, yra Relėjaus atstumas. Jis apibrėžiamas kaip atstumas z_R išilgai pluošto sklidimo krypties nuo pluošto sąsmaukos iki vietos, kur pluošto skersmuo padidėja $\sqrt{2}$ karto. Jis išreiškiamas taip:

$$z_R = \frac{\pi w_F^2}{\lambda M^2}, \quad (1.6)$$

čia w_F – pluošto spindulys sąsmaukoje. Tūris, į kurį fokusuojant lęšiu sukonzentruojama Gauso pluošto energija, priklauso nuo pluošto sąsmaukos spindulio bei ilgio:

$$V_F \sim z_R w_F^2 = \frac{\lambda^3 F^4 M^6}{\pi^3 w_L^4}. \quad (1.7)$$

Kai optinės sistemos skaitinė apertūra nėra didelė, galioja sąryšis

$$NA \approx \frac{w_L}{F}, \quad (1.8)$$

todėl gauname, kad mažiausias tūris, į kurį gali būti sukonzentruojama pluošto energija lęšio židinyje, yra atvirkščiai proporcingas lęšio skaitinės apertūros ketvirtajam laipsniui:

$$V_F \sim \frac{\lambda^3}{\pi^3} \frac{1}{NA^4}. \quad (1.9)$$

Todėl kuo didesnė lęšio skaitinė apertūra, tuo į mažesnę dėmę gali būti sufokusuojamas pluoštas. Tai reiškia, kad slenkstinė energijos vertė fotoardymo procesui taip pat bus mažesnė.

Iš skaitinės apertūros apibrėžimo akivaizdu, kad egzistuoja du būdai, kaip ją padidinti. Pirmasis, ganėtinai brangus būdas, yra didinti fokusuojančių optinių elementų skersmenį, antrasis – mažinti židinio nuotolį, o kartu ir atstumą tarp fokusuojančio objektyvo ir spinduliuote veikiamo objekto.

Ragenos lopo formavimo procedūroje impulsai fokusuojami per ragenos paviršių išplokštinantį stikliuką (0,5–1 mm storio) nedideliame, maždaug 100–160 μm , gylyje. Tam, kad ragenos tūryje būtų galima suformuoti ištisinį burbuliukų sluoksnį, lazerio pluošto sąsmauka turi būti skenuojama 8–10 mm skersmens plote. Todėl pluoštas dažniausiai valdomas galvanometriniais veidrodėlių skeneriais, o fokusavimui naudojamas už galvanometrinių skenerių patalpintas sudėtingas ir didelis objektyvas, kuris išlaiko pastovų pluošto fokusavimo gylį visame lazerio impulsais veikiamame plote. Dėl šios priežasties atstumas nuo objektyvo iki akies negali būti labai mažas, tipiskai komercinėse sistemose jis siekia kelis centimetrus. Iš kitos pusės, fokusuo-

1. Lazerinė refrakcinė chirurgija

jančio objektyvo skersmenį praktiškai riboja žmogaus veido geometrija, t. y. atstumas tarp akies ir nosies, antakio padėtis bei nosies dydis. Todėl ragenos lopo pjovimui naudojamų komercinių femtosekundinių lazerinių sistemų objektyvų tipinės skaitinės apertūros siekia 0,2–0,3 [101].

Naudojant mažesnės skaitinės apertūros fokusuojantį objektyvą lazerio pluoštas fokusuojamas į didesnę dėmę, todėl reikia naudoti didesnės energijos impulsus ir ragenos tūryje formuojami didesni burbuliukai. Dėl didelio pluošto sąsmaukos ilgio prastėja gylio skyra, o didinant spinduliuotės intensyvumą plazma pradeda formotis vis arčiau lęšio, o ne siauriausioje pluošto sąsmaukos vietoje. Darosi sunku tiksliai kontroliuoti pjūvio gylį. Dar vienas mažos skaitinės apertūros objektyvų trūkumas – viršijus kritinę galią P_{kr} , netoli židinio pasireiškia savaiminis pluošto fokusavimasis. Gauso pluoštui ši galia apytiksliai gali būti išreiškiamą taip:

$$P_{kr} \approx 0,15 \frac{\lambda^2}{n_0 n_2}, \quad (1.10)$$

čia n_0 – tiesinis, o n_2 – netiesinis medžiagos lūžio rodikliai. Kritinė fokusavimosi galia nusako sąlygą, kai fokusavimosi reiškinys atsveria pluošto difrakcinę skėstį. Todėl kuo pluošto skėstis mažesnė (mažesnė fokusuojančio objektyvo skaitinė apertūra), tuo mažesnio netiesinio lūžio rodiklio n_2 pakanka jai kompensuoti. M. Miclea su bendraautoriais nustatė, kad *ex vivo* kiaulės ragenai kritinė fokusavimosi galia yra $P_{kr} = 1,2 \text{ MW}$ [102]. Jie taip pat pademonstravo, kad didinant spinduliuotės galią dėl netiesinio lūžio rodiklio ragenoje keičiasi fokusavimo gylio. Kitas pašalinis reiškinys, kuris stebimas fokusuojant didelės energijos ($\sim 2 \mu\text{J}$) impulsus mažos skaitinės apertūros objektyvu, yra plonų (200–500 nm) tamsių ruoželių formavimasis ragenoje išilgai pluošto sklidimo krypties [103]. Šie ruoželiai stebimi atlikus histologinius ragenos pjūvius, o jų atsiradimas siejamas su fokusavimosi metu susidariusiose gijose sukurtais laisvaisiais elektronais. Manoma, kad tamsūs ruoželiai susiformuoja kai laisvųjų elektronų tankis šviesos gijose nepasiekia plazmos tankio, tačiau yra pakankamai didelis, kad inicijuotų kolageną ardančias chemines reakcijas [103]. Kaip parodė tyrimai, tokie pakitimai ragenoje išlieka net praėjus dviems savaitėms po operacijos [104].

Apibendrinant galima suformuluoti pagrindinius reikalavimus lazerinei sistemai, kurie užtikrintų aukštą ragenos lopo formavimo procedūros kokybę:

1. fokusuojančios optikos skaitinė apertūra turi būti kuo didesnė, pageidautina $NA \approx 0,3$;

2. lazerio impulso trukmė $200 \text{ fs} < \tau < 300 \text{ fs}$;
3. pluošto intensyvumo skirstinys turi būti artimas Gauso skirstiniui (pluošto kokybė $M^2 \approx 1$).

1.4.2 Fotoabliacija

Medžiagą veikiant didelio intensyvumo spinduliuote, sugerta šviesa sužadina molekules, atomų branduoliai pradeda virpėti ir molekulės sąlyginai išsiplečia. Sumažėjus atstumui tarp molekulių, jos pradeda viena kitą stumti. Jeigu per impulso trukmę sugerta energija yra pakankamai didelė ir nutraukiamų molekulinų ryšių skaičius viršija slenkstinę ribą, įvyksta fotoabliacija – spinduliuote veikiamą medžiagą išstumia dar nespėjus perduoti savo kinetinės energijos gretimoms zonoms. Išstumiamų molekulinų darinių dydis priklauso nuo spinduliuotės energijos tankio – kuo daugiau spinduliuotės sugerama, tuo daugiau nutraukiama molekulinų ryšių ir mažėja šalinamų medžiagos fragmentų dydis.

Fotoabliacijos proceso metu medžiaga šalinama preciziškai, be terminio poveikio aplinkiniams audiniams. Tai leidžia kontroliuojamai modifikuoti audinio paviršius. Naudojant nanosekundinius arba trumpesnius UV šviesos impulsus, medžiaga ardoma kai viršijama slenkstinė abliacijos proceso intensyvumo vertė (10^7 W/cm^2 – 10^8 W/cm^2).

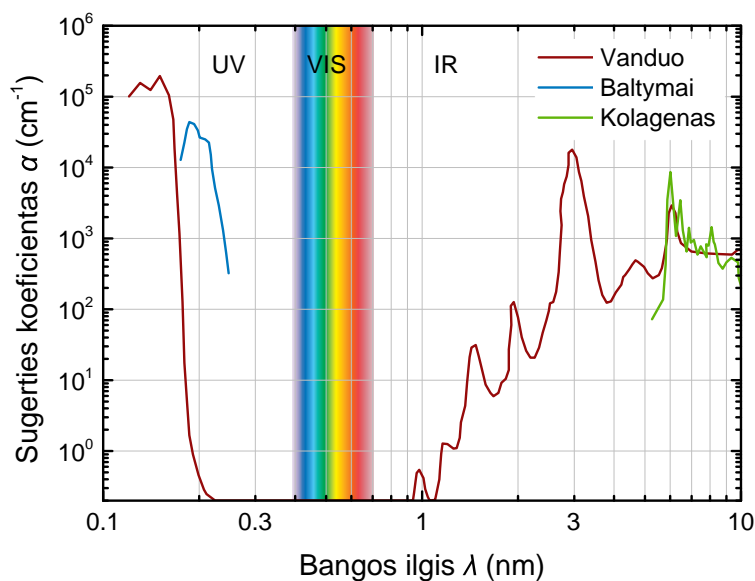
Pirmieji polimerinių organinių medžiagų fotoabliacijos procesą 1982 m. stebėjo R. Srinivasan ir V. Mayne–Banton [105]. Veikdami polietileno tereftalata eksimerinio ArF lazerio 193 nm bangos ilgio nanosekundiniais impulsais (50 – 400 mJ/cm^2), jie tolygiai šalino paviršinį medžiagos sluoksnį ir šį procesą apibūdino kaip fotocheminį medžiagos ardymą. Vėliau išsamūs fotoabliacijos proceso tyrimai buvo atlikti naudojant organinius polimerus (polimetilmetakrilatą (PMMA), tefloną, poliamidą ir kt.) bei biologinius audinius [59, 106]. Šiandien fotoabliacija plačiai taikoma lazerinėse refrakcijoje regos korekcijos operacijose ragenos laužiamosios gebos modifikavimui. Tam naudojama eksimerinių ArF lazerių (193 nm) arba kietakūnių lazerių aukštesniųjų harmonikų (210–213 nm) nanosekundinė spinduliuotė.

Pirmoji sąlyga, kad vyktų abliacijos procesas – šviesa turi būti efektyviai sugerama medžiagos paviršiuje. Šviesos sugertis nesklaidančiame audinyje aprašoma Lamberto dėsnium:

$$I(z) = I_0 (1 - R_s) \exp(-\alpha z), \quad (1.11)$$

čia z – atstumas, I_0 – krintančios šviesos intensyvumas, R_s – atspindžio

1. Lazerinė refrakcinė chirurgija



1.7 pav. Vandens, kolageno ir kitų baltymų sugerties koeficientų priklausomybė nuo bangos ilgio. Adaptuota iš [44].

koeficientas, α – audinio sugerties koeficientas.

Bendru atveju, biologinio audinio sugerties savybėms didžiausią įtaką daro baltymai, DNR, melaninas, hemoglobinas ir vanduo. Jų optinių savybių reikšmė smarkiai priklauso nuo bangos ilgio. Šiame darbe daugiausiai dėmesio skiriama lazerinės spinduliuotės sąveikai su rageną, todėl 1.7 pav. pateikiama akies rageną sudarančių komponentų – vandens, kolageno ir kitų baltymų – sugerties spektrai, kurių superpozicija ir charakterizuoja bendrą akies ragenos sugerties spektrą.

Audinių abliacijai ypač svarbus ultravioletinis optinio spektro diapazonas (180–400 nm). Paprastai UV srityje audinio sugertį lemia baltymai, DNR ir melaninas, o itin trumpų bangų srityje (ties $\lambda \approx 190$ nm) didžiausią svarbą turi peptidinės jungtys ($\text{O}=\text{C}-\text{N}-\text{H}$), kurios yra visuose baltymuose [107]. Todėl audiniuose, kurie turi didelę baltymo kolageno koncentraciją (pvz. rageną, odą), sugerties koeficientas ties ~ 190 nm yra labai didelis $\alpha = (2-4) \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$ [108, 109].

Fotoabliaciją galima apibendrinti kaip dvipakopį sužadavimo ir disociacijos procesą. Pagrindinių organinių molekulinų ryšių disociacijos energijos pateiktos 1.2 lentelėje. Verta paminėti, kad kuo trumpesnis lazerio bangos ilgis, tuo daugiau įvairių molekulinų ryšių nutraukiama, tuo smulkesni medžiagos fragmentai pašalinami abliacijos metu [110]. Todėl apdirbto paviršiaus kokybė priklauso nuo naudojamo lazerio bangos ilgio.

Antroji fotoabliacijos sąlyga – per lazerio impulso trukmę audinio tūryje turi būti sugertas tam tikras energijos kiekis, kuris užtikrintų, jog mole-

1.2 lentelė Pagrindinių organinių molekulinųjų ryšių disociacijos energijos ir jas atitinkantys šviesos bangų ilgiai.

Molekulinė jungtis	Ryšio energija (eV)	Bangos ilgis (nm)	Molekulinė jungtis	Ryšio energija (eV)	Bangos ilgis (nm)
C=O	7,5	165	C–O	3,6	345
C=C	6,4	194	C–C	3,6	345
O–H	4,8	258	S–H	3,5	354
C–H	4,3	288	C–N	3,0	414
N–H	4,1	303			

kulinių ryšių disociacijos sparta bus didesnė nei nutrauktųjų ryšių rekombinacijos sparta. Tai reiškia, kad lazerio spinduliuotės intensyvumas turi viršyti tam tikrą slenkstinę vertę I_{sl} , kuriai esant nutraukiamųjų molekulinųjų ryšių skaičius tūrio vienetu yra pakankamas, kad medžiagos fragmentai būtų išstumiami. Ši sąlyga užrašoma taip:

$$I_0(1 - R_s) \exp(-\alpha z) \geq I_{sl}. \quad (1.12)$$

Jeigu spinduliuotės intensyvumas mažesnis už slenkstinį, sugerta impulso energija virsta molekuliniais virpesiais – audinys šyla, garuoja skysčiai, koaguliuoja baltymai. Kai viršijama slenkstinė spinduliuotės intensyvumo vertė, abliacijos procesas audinyje vyksta iki tam tikro gylio, kol tenkinama (1.12) lygtis. Todėl abliacijos gylį galima išreikšti taip:

$$d = \frac{1}{\alpha} \ln \frac{I_0(1 - R_s)}{I_{sl}}. \quad (1.13)$$

Šis sąryšis galioja tol, kol nėra viršijamas plazmos generavimo slenkstinis intensyvumas I_{pl} . Viršijus I_{pl} vertę pradedama generuoti plazma, sugerianti lazerinius impulsus smarkiau nei pats audinys, ir abliacijos gylis pradeda nebe priklausyti nuo intensyvumo [38].

Mūsų eksperimentuose naudojamos Yb:KGW femtosekundinio lazerio penktosios harmonikos spinduliuotės bangos ilgis yra 205 nm. Šios spinduliuotės fotono energija ($h\nu = 6,0$ eV) yra pakankama, kad būtų suardyti daugelis organinių molekulinųjų ryšių (žr. 1.2 lentelę). Todėl viršijus slenkstinę intensyvumo vertę, vyksta ragenos fotoabliacija, t. y. audinys šalinamas be šalutinių terminųjų pažeidimų.

2 skyrius

Šiluminių reiškinių įtakos valdymas UV harmonikų generatoriuje

Femtosekundiniai lazeriniai impulsai naudojami ne tik oftalmologijoje, bet ir įvairiuose moksliniuose taikymuose, industriniuose medžiagų apdirbimo procesuose bei medicinoje [103, 111]. Pagrindinis femtosekundinių impulsų privalumas lazeriniame medžiagų apdorojime – tai galimybė preciziškai apdirbti įvairias medžiagas termiškai jų nepažeidžiant. Kai kietakūniai femtosekundiniai lazeriai naudojami kartu su netiesiniais optiniais dažnio keitikliais – aukštesniųjų lazerio spinduliuotės harmonikų moduliais – ultratrumpuosius impulsus galima generuoti ir UV diapazone. Tokios sistemos tampa labai patrauklios medžiagų, pasižyminčių dideliu šiluminiu laidumu (pvz. metalų, puslaidininkių), preciziam mikroapdorojimui. Tokiose medžiagose UV impulsai yra sugeriami žymiai efektyviau nei aIR arba regimojo diapazono spinduliuotė.

Didelio impulsų pasikartojimo dažnio femtosekundiniai lazeriai su UV harmonikų moduliais nėra plačiai naudojami industrijoje. Tam yra keletas priežasčių. Pirma, norint naudoti ultratrumpuosius UV srities impulsus vietoj aIR arba regimojo diapazono spinduliuotės, išauga reikalavimai dielektrinėms optinių komponentų dangoms. Maža to, norint išvengti greito dangų degradavimo bei optinio pažeidimo, būtina užtikrinti, kad optinių elementų aplinkoje nebūtų organinių medžiagų (jie turi būti vakuume arba švaraus oro ar inertinių dujų aplinkoje). Antra, dėl didelio UV impulsų intensyvumo kristaluose ir stikluose [112–115] pasireiškia dvifotonė sugertis, dėl kurios skaidriuose optiniuose elementuose (dalikliuose, lęšiuose, languose) atsiranda papildomi nuostoliai, formuojasi termolėšis. Todėl dažnai

tiek laikinės, tiek erdvinės harmonikų generatoriaus išėjimo spinduliuotės charakteristikos gali būti pastebimai iškraipytos. Kartais nepageidaujamų efektų galima išvengti vietoj skaidrių optinių elementų naudojant atspindinčią optiką, pavyzdžiui, vietoj lęšių – sferinius veidrodžius. Deja, dvifotonė sugertis taip pat pasireiškia ir netiesiniuose optiniuose kristaluose (β -bario borate (BBO), kalio dihidro fosfate (KDP), cezio ličio borate (CLBO), ličio triborate (LBO) ir kt.), kurie naudojami bangos ilgio konvertavimui į UV diapazoną [25, 114, 116–118]. Esant dideliame lazerio impulsų pasikartojimo dažniui (>1 kHz), dėl UV spinduliuotės sugerties netiesiniuose optiniuose kristaluose krinta dažnio keitimo efektyvumas, kristalo tūryje generuojama šiluma ir keičiasi fazinio sinchronizmo sąlygos. Šiandieninės technologijos leidžia išauginti vis aukštesnės kokybės netiesinius kristalus, turinčius mažiau optinių defektų bei tirpiklio intarpų, todėl optinių defektų sugertis UV srityje yra gana maža [119, 120]. Tačiau jei tik dviejų didelės energijos ultratrumpo UV impulso fotonų suminė energija viršija kristalo draustinės energijos tarpą, medžiagoje pasireiškia dvifotonė sugertis. Taigi, naudojant didelio pasikartojimo dažnio impulsus, išvengti šiluminių efektų nepavyksta.

Neseniai C. Rothhardt su bendraautoriais pademonstravo, kad didelės galios 1030 nm pikosekundinės spinduliuotės dažnio dvigubavimo metu BBO kristale indukuoti šiluminiai efektai gali būti efektyviai sumažinti netiesinį kristalą patalpinus tarp dviejų safyro plokštelių [27]. Dėl didelio safyro šiluminio laidumo tokia „sumuštinio“ struktūra efektyviai mažina temperatūrinius gradientus BBO kristale. Tačiau šią struktūrą sunku realizuoti techniškai, juo labiau, tame pačiame šaltinyje teigiama, jog apsaugine danga padengtų BBO kristalo paviršių pritvirtinti prie safyro plokštelių nepavyko. Be to, generuojant femtosekundinius UV impulsus, ši ir kitos panašios paviršių šaldymo technikos [121] retai kada gali būti taikomos, nes: 1) dvifotonė sugertis pasireiškia ne tik netiesiniame kristale, bet ir aušinimui naudojamose medžiagoje, 2) atsiranda papildomi atspindžiai nuo paviršių, todėl mažėja bendras netiesinio optinio dažnio keitiklio efektyvumas; 3) dėl papildomos grupinių greičių dispersijos aušinančioje medžiagoje didėja ultratrumpo impulso trukmė (tai ypač stipriai pasireiškia UV diapazone). Šiluminių reiškinių įtaka kai kuriais atvejais gali būti sumažinta naudojant išorinio šaldymo technikas [28, 29], tačiau šie metodai nėra veiksmingi kai lazerio spinduliuotė greitai moduluojama laike.

Mes tyrėme šiluminius procesus, vykstančius femtosekundinio Yb:KGW lazerio ketvirtosios harmonikos generatoriuje. Naudodami teorinį modelį pademonstravome, kad, lazeriui veikiant kelių dešimčių kilohercų pasikartoji-

2. Šiluminių reiškinių įtakos valdymas

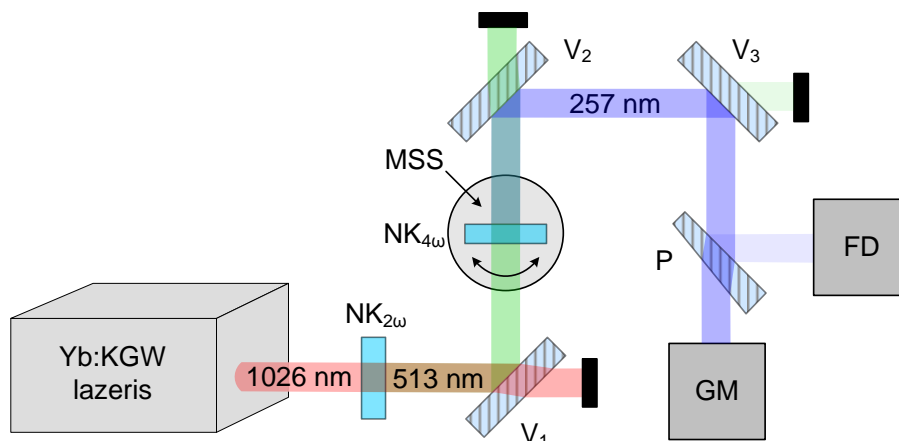
mo dažniu, netiesinio optinio dažnio keitiklio spinduliuotės galios dinamika yra tiesiogiai susieta su ketvirtosios harmonikos kristalo temperatūros kitimu dėl UV spinduliuotės sugerties bei šilumos mainų su aplinka. Šiluminių reiškinių įtaka harmonikų generatoriaus išėjimo charakteristikoms po lazerinės sistemos įjungimo buvo efektyviai sumažinta naudojant adaptyvų ketvirtosios harmonikos kristalo sinchronizmo kampo valdymą. Šis metodas leido sutrumpinti UV spinduliuotės galios nusistovėjimo laiką trimis eilėmis – nuo keliasdešimt sekundžių iki 50 ms.

2.1 Yb:KGW lazerio ketvirtosios harmonikos generatorius

Tyrimams buvo naudojamas aIR femtosekundinis kietakūnis Yb:KGW lazeris ($\lambda = 1026$ nm) „Pharos“ (UAB MGF “Šviesos konversija”, Lietuva) veikiantis 50 kHz impulsų pasikartojimo dažniu, kurio vidutinė fundamentinės spinduliuotės galia 3 W, o impulso trukmė 280 fs. Lazerio pluošto intensyvumo profilis buvo artimas Gauso skirstiniui ($M^2 = 1,1$), o skersmuo lygus 1,5 mm (išmatuota $1/e^2$ maksimalaus intensyvumo lygyje).

Femtosekundiniai UV impulsai buvo gaunami generuojant ketvirtąją lazerio spinduliuotės harmoniką naudojant 2.1 pav. pavaizduotą optinę schemą. Fundamentinė lazerio spinduliuotė buvo konvertuojama į antrąją (513 nm), o iš jos – į ketvirtąją (257 nm) harmoniką netiesiniuose optiniuose BBO kristaluose NK_{2 ω} (ilgis 2 mm, išpjautas kampu $\theta_{PM2\omega} = 23,5^\circ$) ir NK_{4 ω} (ilgis 0,7 mm, išpjautas kampu $\theta_{PM2\omega} = 50,4^\circ$). Kristalo NK_{4 ω} fazinio sinchronizmo kampas buvo derinamas naudojant sukimo staliuką su žingsniniu varikliu (MSS). Sugeneruota ketvirtosios harmonikos spinduliuotė nuo nekonvertuotos antrosios harmonikos spinduliuotės buvo atskirta dielektriniais veidrodžiais V₂ ir V₃.

257 nm impulsai buvo registruojami greitai ir UV srityje jautriai silicio fotodetektoriumi („DET10A“, „Thorlabs“, JAV). Fotodetektoriaus (FD) signalai buvo registruojami sinchronizuotai su lazerio impulsais. Detektoriaus atsako funkcija buvo sukalibruota naudojant galios matuoklį „Ophir Nova II“ su šiluminiu galios jutikliu „30A-BB-18“ („Ophir Optronics“, Izraelis). Netiesinio kristalo NK_{4 ω} paviršiaus temperatūros skirstinys buvo registruojamas naudojant infraraudonąją kamerą „ThermaCAM S65“ („FLIR Systems“, JAV). Vertinant temperatūros skirstinį ketvirtosios harmonikos BBO kristale buvo laikoma, kad skaidrinančia dielektrine danga dengto kristalo spinduliavimo geba $\epsilon = 0,82$. Ši spinduliavimo gebos vertė buvo nustaty-



2.1 pav. Femtosekundinio Yb:KGW lazerio ketvirtosios harmonikos generatoriaus laikinių charakteristikų matavimo schema. V_1 – V_3 – dielektriniai veidrodžiai, $NK_{2\omega}$, $NK_{4\omega}$ – netiesiniai optiniai kristalai, P – pleištas, MSS – motorizuotas sukimo staliukas, FD – fotodetektorius, GM – galios matuoklis.

ta atlikus atskirą matavimą: įkaitinus kristalą iki 60°C buvo užfiksuotas termografinis galinio kristalo paviršiaus vaizdas, o parinkus emisijos gebos vertę termokamera užfiksuota kristalo temperatūra buvo sulyginta su tikrąja kristalo temperatūra.

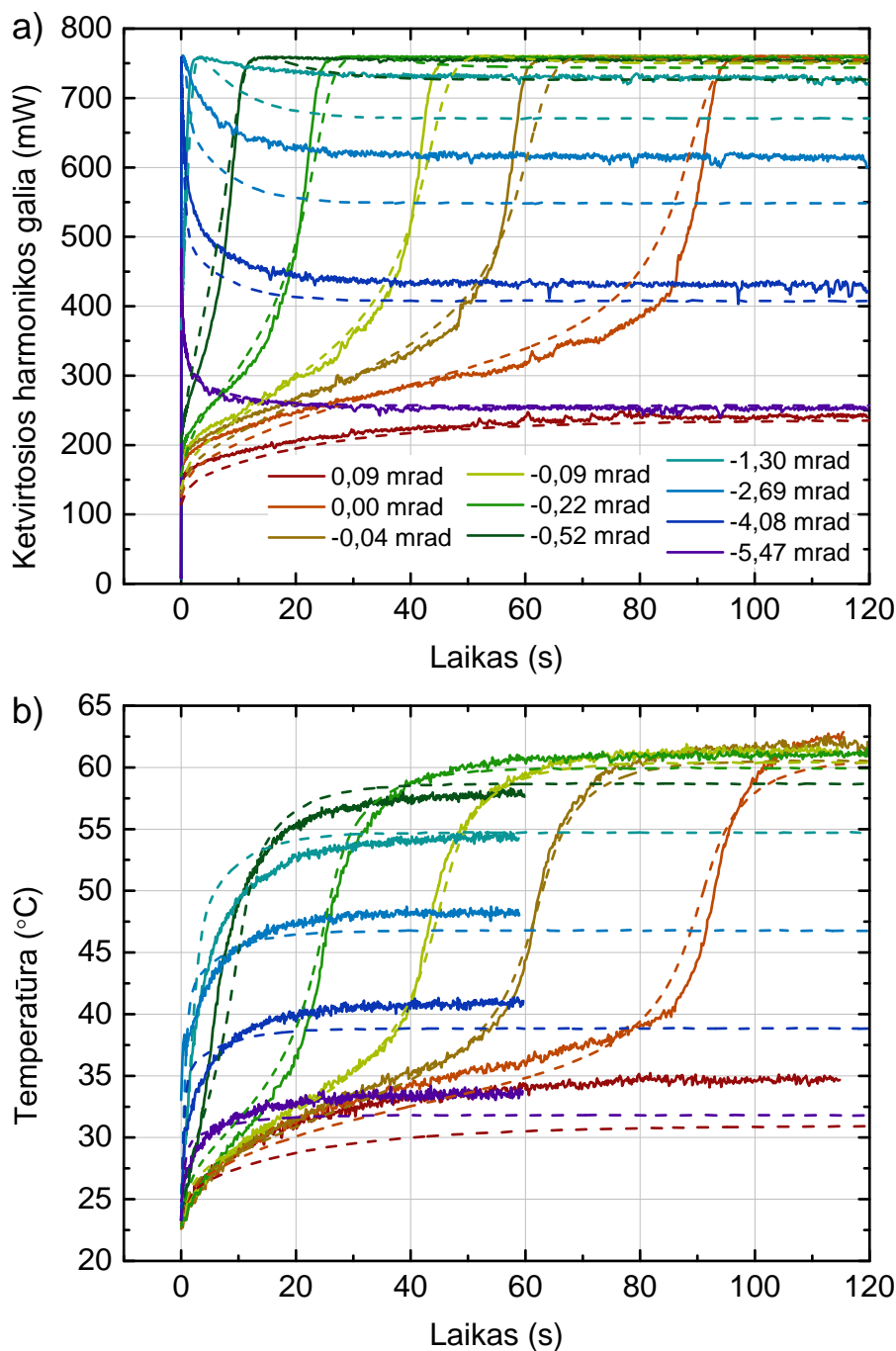
Laikinės spinduliuotės charakteristikos

Netiesiniuose optiniuose kristaluose generuojant femtosekundinio aIR lazerio spinduliuotės aukštesniąsias harmonikas (pvz. ketvirtąją arba penktąją), tiesinė ir netiesinė UV spinduliuotės sugertis kristale gali reikšmingai pakeisti kristalo temperatūrą, o kartu ir fazinio synchronizmo sąlygą¹. Dėl šių šiluminių reiškinių harmonikų generavimo kristale, įjungus didelio impulsų pasikartojimo dažnio femtosekundinio aIR lazerio kaupinimo spinduliuotę, kuri laiką keičiasi UV harmonikų spinduliuotės galia. Galios kitimo pobūdis bei trukmė stipriai priklauso nuo pradinio UV spinduliuotę generuojančio kristalo fazinio synchronizmo derinimo kampo. Tam, kad pademonstruotume šią priklausomybę, išmatavome ketvirtosios harmonikos galios bei kristalo temperatūros laikines priklausomybes esant skirtingiems ketvirtosios harmonikos kristalo fazinio synchronizmo derinimo kampams.

¹Atkreipkite dėmesį, kad generuojant antrąją 1026 nm femtosekundinės spinduliuotės harmoniką, BBO kristalo kaitimas dėl daugiafotonės sugerties nėra reikšmingas, nes dviejų 513 nm bangos ilgio fotonų suminė energija neviršija BBO kristalo draustinės energijos tarpo [122]. Todėl, matuojant ketvirtosios harmonikos galią, galima stebime šiluminius efektus, tiesiogiai susijusius su BBO kristalo $NC_{4\omega}$ kaitimu.

2. Šiluminių reiškinių įtakos valdymas

Ketvirtosios harmonikos galios bei kristalo temperatūros dinamikos po lazerio spinduliuotės įjungimo pavaizduotos 2.2 pav. Ištisinėmis linijomis žymima išmatuota ketvirtosios harmonikos galia (2.2 pav, a) ir netiesinio kristalo galinio paviršiaus temperatūra (2.2 pav, b) esant skirtingiems ket-



2.2 pav. Išmatuotos (ištisinės linijos) bei sumodeliuotos (brūkšninės linijos) ketvirtosios harmonikos galios (a) bei netiesinio kristalo temperatūros (b) priklausomybės nuo laiko, praėjusio po lazerio spinduliuotės įjungimo, esant skirtingiems kristalo posūkio kampams θ . Legendoje pateikiamos išderinimo kampo vertės $\Delta\theta \equiv \theta - \theta_0$ (žr. tekstą).

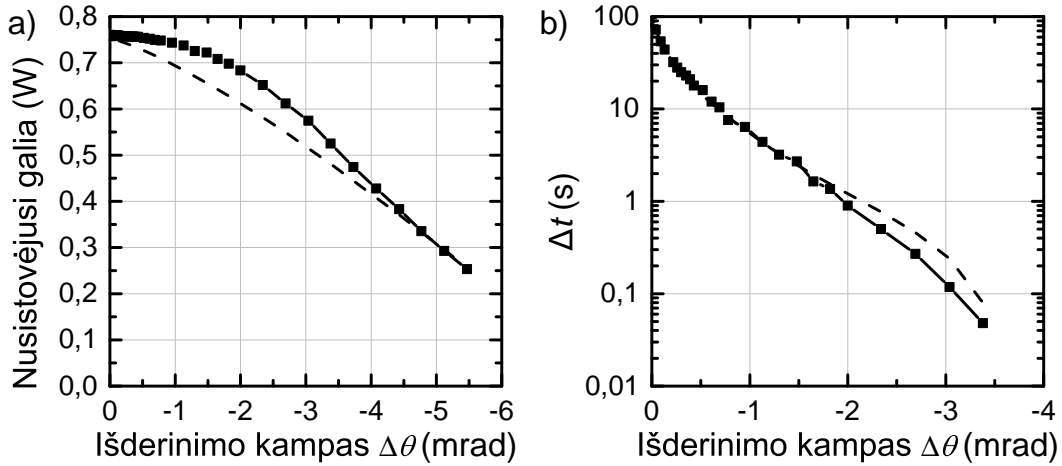
2.1. Yb:KGW lazerio ketvirtosios harmonikos generatorius

virtosios harmonikos kristalo $NK_{4\omega}$ išderinimo kampams $\Delta\theta \equiv \theta - \theta_0$. $\Delta\theta$ apibrėžiamas kaip kristalo posūkio kampo θ nuokrypis nuo atskaitos kampo θ_0 , ties kuriuo optimaliai tenkinama fazinio sinchronizmo sąlyga ir generuojama didžiausia ketvirtosios harmonikos galia $P_m = 760$ mW, kai harmonikų generatorius suderintas nepertraukiamai veikai. Šiuo atveju, kai $\Delta\theta = 0$, taip pat buvo užregistruota ir didžiausia kristalo paviršiaus temperatūra lazerio pluošto centre, $T_m = 62$ °C. Tam, kad būtų paprasčiau užrašyti matematinės išraiškas, kristalo posūkio kampus perskaičiavome į vidinius kampus tarp šviesos sklidimo krypties ir netiesinio kristalo optinės ašies (toku pačiu būdu, kaip yra apibrėžiamas fazinio sinchronizmo kampas kristale). Verta atkreipti dėmesį, kad kristalo išderinimo kampas $\Delta\theta$ nėra tapatus fazinio sinchronizmo išderinimo kampui $\Delta\theta_{PM}(T) \equiv \theta - \theta_{PM}(T)$, nes optimali fazinio sinchronizmo sąlyga priklauso nuo temperatūros pasiskirstymo kristale skersai lazerio pluošto, o temperatūros pasiskirstymas dar priklauso ir nuo laiko, praėjusio nuo lazerio spinduliuotės įjungimo.

Įjungus lazerio spinduliuotę esant pradiniam ketvirtosios harmonikos kristalo išderinimo kampui $\Delta\theta = 0$ (2.2 pav., a, oranžinė linija), pirmąsias 80 s sugeneruotos UV spinduliuotės galia auga lėtai, po to pradeda staigiai didėti, bei pasiekia maksimalią vertę. Pradinį lėtą galios augimą galima gana paprastai paaiškinti – įjungus kaupinimo spinduliuotę kristalo temperatūra artima kambario temperatūrai, todėl fazinio sinchronizmo išderinimo kampas $\Delta\theta_{PM}$ yra didelis, o dažnio keitimo efektyvumas – mažas. Todėl pradinės ketvirtosios harmonikos spinduliuotės nepakanka, kad dėl UV sugerties indukuotas pradinis šilumos kiekis reikšmingai pakeltų kristalo temperatūrą. Tikėtai dėl teigiamo grįžtamojo ryšio (daugiau UV spinduliuotės – labiau kaista kristalas) fazinis išderinimas palaipsniui mažėja, kol galiausiai pasiekiamas optimali fazinio sinchronizmo sąlyga bei generuojama maksimali ketvirtosios harmonikos galia.

Mažinant kristalo posūkio kampą nuo pradinės jo vertės θ_0 (t. y. mažinant kampą tarp pluošto sklidimo krypties ir netiesinio kristalo optinės ašies), ketvirtosios harmonikos galia auga ir pasiekia maksimalią vertę žymiai greičiau (2.2 pav., a, $-2,69$ mrad $\leq \Delta\theta < 0$ mrad). Šiuo atveju pradinis fazinio sinchronizmo išderinimas yra mažesnis, todėl savo ruožtu padidėja ir pradinis indukuojamos šilumos kiekis bei greičiau pasiekiamas fazinio sinchronizmo sąlyga. Dar labiau mažinant kristalo posūkio kampą (kai išderinimo kampas $-5,47$ mrad $\leq \Delta\theta \leq -1,30$ mrad, žr. 2.2 pav., a), optimali temperatūra pasiekiamas dar greičiau, tačiau kristalui ir toliau kaistant ji yra viršijama, fazinis išderinimas pradeda didėti, o ketvirtosios harmonikos

2. Šiluminių reiškinių įtakos valdymas



2.3 pav. Nusistovėjusios ketvirtosios harmonikos galios (a) ir laiko intervalo Δt , per kurį pasiekama maksimali UV spinduliuotės galios vertė (b), priklausomybė nuo ketvirtosios harmonikos kristalo išderinimo kampo $\Delta\theta$. Laiko intervalai atidėti logaritminėje skalėje. Brūkšninės linijos žymi atitinkamus modeliavimo rezultatus.

galia – mažėti.

Parinkus kristalo posūkio kampą taip, kad fazinio synchronizmo sąlyga būtų tenkinama kambario arba žemesnėje temperatūroje ($\Delta\theta = -4,08$ mrad ir $\Delta\theta = -5,47$ mrad, 2.2 pav., a), ketvirtosios harmonikos galia didžiausią vertę pasiekia iš karto. Tada kristalo temperatūra sparčiai kyla dėl tiesinės ir netiesinės UV spinduliuotės sugerties, fazinio synchronizmo išderinimas didėja, o ketvirtosios harmonikos galia sparčiai mažėja.

Kai pradinis kristalo posūkio kampas $\theta > \theta_0$, fazinio synchronizmo sąlyga niekada nepasiekama, nes pradinės UV spinduliuotės intensyvumas per mažas, kad pakankamai pakeltų kristalo temperatūrą (2.2 pav., a, $\Delta\theta = 0,09$ mrad).

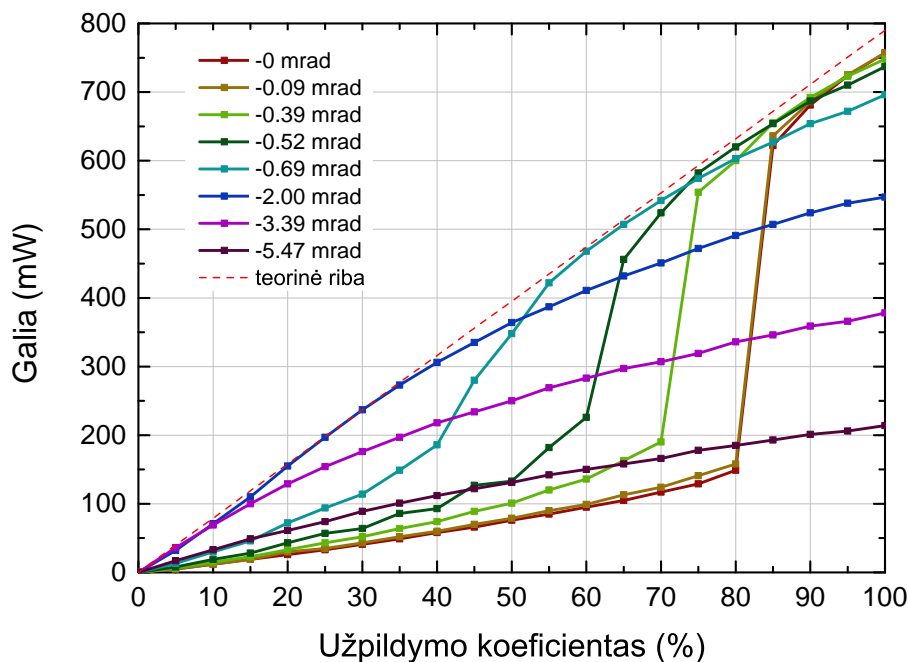
Iš lazerio pluošto centre išmatuotų ketvirtosios harmonikos kristalo temperatūros dinamiką (2.2 pav., b) matyti, kad, mažinant kristalo posūkio kampą, nusistovi vis mažesnė ketvirtosios harmonikos kristalo temperatūra. Kai išderinimo kampas yra pakankamai mažas ($|\Delta\theta| < 0,1$ mrad), kristalo temperatūros priklausomybė nuo laiko savo forma yra artima ketvirtosios harmonikos galios priklausomybei. Laiko intervalas, per kurį nusistovi ketvirtosios harmonikos galia, yra tiesiogiai susijęs su kristalo temperatūra. Šis laikas trumpėja mažinant kristalo posūkio kampą, t. y. mažėjant nuostoviai kristalo temperatūrai.

2.3 pav. pateikti grafikai glaustai atspindi pagrindines ketvirtosios harmonikos generatoriaus spinduliuotės galios dinamikų charakteristikas visame matuotų išderinimo kampų diapazone $-5,47$ mrad $\leq \Delta\theta \leq 0$ mrad.

Nusistovėjusios ketvirtosios harmonikos galios, išmatuotos praėjus 120 s po lazerio spinduliuotės įjungimo, priklausomybė nuo kristalo išderinimo kampo $\Delta\theta$ pavaizduota 2.3 pav., a dalyje. 2.3 pav., b dalyje demonstruojama laiko intervalo, per kurį pasiekama maksimali ketvirtosios harmonikos galia, priklausomybė nuo kristalo išderinimo kampo $\Delta\theta$. Laiko intervalas, per kurį pasiekama maksimali UV spinduliuotės galia, eksponentiškai mažėja, kai kristalo išderinimo kampas keičiamas nuo 0 mrad iki $-3,40$ mrad. Ketvirtosios harmonikos nusistovėjusios galios priklausomybė rodo, kad esant mažiems išderinimo kampams ($-0,5$ mrad $\leq \Delta\theta \leq 0$ mrad), nuostovi galia beveik nekinta, tačiau, kai $\Delta\theta < -0,5$ mrad, sugeneruotos ketvirtosios harmonikos galia ima mažėti.

Impulsų voros moduliavimas

Praktiniuose taikymuose, pvz. medžiagų mikroapdirbime, dažniausiai impulsinis lazerio pluoštas yra ne tik valdomas apdirbamo objekto paviršiuje ir/ar tūryje, bet ir moduluojamas laike (įjungiamas ir išjungiamas). Tam, kad pademonstruotumėm, kokią įtaką lazerio impulsų voros moduliavimas turi ketvirtosios harmonikos generatoriaus išėjimo charakteristikoms, moduliavome lazerio impulsų vorą dažnio keitiklio įėjime ir matavome vidutinę ketvirtosios harmonikos spinduliuotės galią.



2.4 pav. Ketvirtosios harmonikos vidutinės galios priklausomybė nuo moduliuojančiojo signalo užpildymo koeficiento, esant skirtingiems kristalo išderinimo kampams. Brūkšninė linija žymi teorinę ribą.

2. Šiluminių reiškinių įtakos valdymas

Lazerio impulsų vora dažnio keitiklio įėjime buvo moduluojama valdant elektrooptinę sklendę stačiakampio formos signalu, kurio periodas buvo 20 ms. 2.4 pav. pateikta išmatuota ketvirtosios harmonikos vidutinės galios priklausomybė nuo impulsų voros užpildymo koeficiento² k_m esant skirtingoms ketvirtosios harmonikos kristalo sinchronizmo kampo išderinimo vertėms. Kai ketvirtosios harmonikos fazinio sinchronizmo išderinimo kampas parenkamas taip, kad užtikrintų optimalų veikimą nmoduliuoto lazerio signalo atveju ($\Delta\theta = 0$ mrad), o užpildymo koeficientas kinta ribose $85\% < k_m < 100\%$, harmonikų generatoriaus galia mažai nukrypsta nuo teorinės vertės (2.4 pav., brūkšninė linija). Tačiau kai užpildymo koeficientas $k_m < 85\%$, temperatūros balansas kristale smarkiai pakinta bei drastiškai sumažėja ketvirtosios harmonikos galia.

Vidutinė netiesinio kristalo temperatūra stipriai priklauso nuo moduliuojančiojo signalo užpildymo koeficiento (t. y. nuo vidutinės sugeneruotos ketvirtosios harmonikos galios), dėl to keičiasi ir fazinio sinchronizmo sąlygos. Kai moduliavimo periodas yra pakankamai mažas (keliasdešimt milisekundžių ar trumpesnis), esant tam tikram impulsų voros užpildymo koeficientui k_m , varijuojant kristalo išderinimo kampą galima keisti ketvirtosios harmonikos vidutinį generavimo efektyvumą ir galios kitimo fronto pobūdį. Panašiai kaip ir 2.2 pav. pavaizduotais atvejais po kaupinimo spinduliuotės įjungimo, taip ir periodiškai moduliuojant spinduliuotę, fronto pobūdis priklausys nuo išderinimo kampo. Keičiant kristalo išderinimo kampą galima stebėti impulsų voros galios augimą arba kritimą, o idealiu atveju – beveik visiškai statų frontą ir pastovią galią visos impulsų voros metu. Tačiau tai galioja tik siauram užpildymo koeficiento verčių diapazonui.

Iš 2.4 pav. taip pat matyti, kad, esant bet kokiam kristalo išderinimo kampui, dažnio keitimo efektyvumas niekada nepasiekia maksimalios vertės (brūkšninė linija), kai moduliacijos koeficientas $k_m > 70\%$. Šis konvertavimo efektyvumo sumažėjimas gali būti siejamas su termolėšio susiformavimu ketvirtosios harmonikos kristale. Termolėšio formavimosi hipotezę taip pat patvirtino iš karto po lazerio spinduliuotės įjungimo (augant kristalo temperatūrai) tolimajame lauke stebėti ketvirtosios harmonikos pluošto profilio iškraipymai.

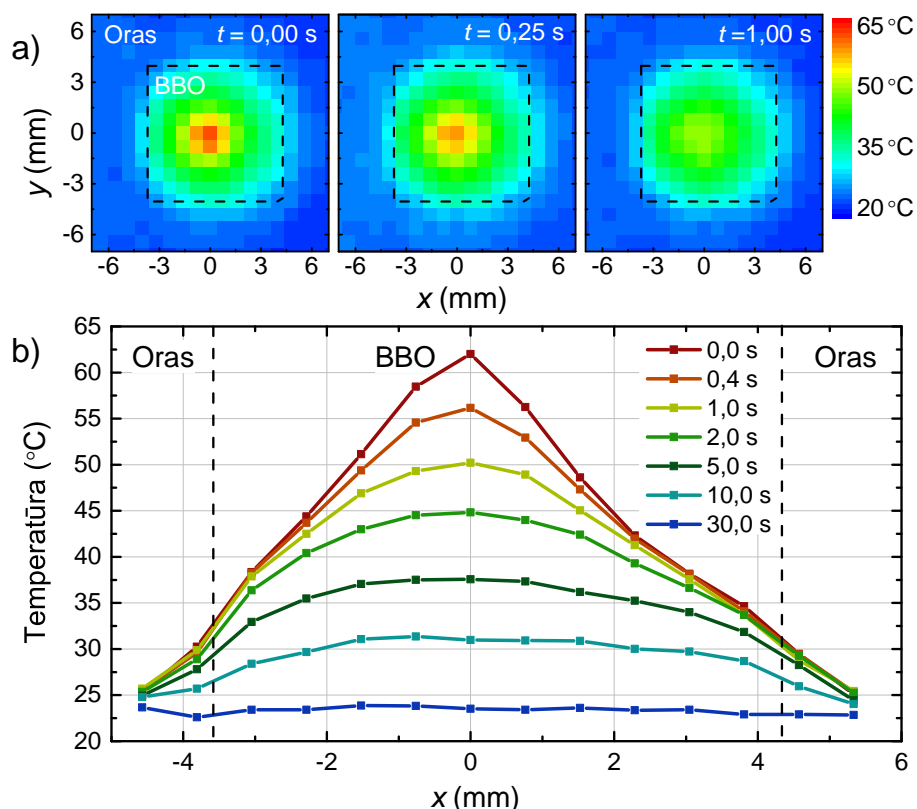
Taip pat iš 2.4 pav. galima pastebėti vieną svarbią tendenciją – jeigu signalo moduliacija yra pastovi (taigi ir netiesinio kristalo temperatūra yra pastovi), visada galima parinkti tokį kristalo fazinio sinchronizmo išderini-

² $k_m = 100\%$ – nepertraukiama impulsų vora; $k_m = 0\%$ – lazerio spinduliuotė visą laiką išjungta; $k_m = 50\%$ – pauzių trukmė tarp impulsų vorų ($\tau_p = 10$ ms) lygi impulsų voros trukmei ($\tau_v = 10$ ms)

mo kampa, kad spinduliuotės konvertavimo efektyvumas būtų maksimalus. Todėl norint išvengti neigiamos moduliotos lazerinės spinduliuotės sukeltų šiluminių reiškinių įtakos mikroapdirbimo (mūsų atveju, lazerinės refrakcijos korekcijos) metu, pakanka išlaikyti vienodą spinduliuotės moduliavimo dažnį ir, atsižvelgiant į kristalo temperatūrą, parinkti optimalius netiesinių kristalų posūkio kampus. Tačiau šis būdas pasiteisina tik esant pastoviai kristalo temperatūrai ir neišsprendžia problemų, susijusių su kristalo kaitimu po lazerio spinduliuotės įjungimo. Vienas, kantrybės reikalaujantis, variantas – įjungus kaupinimą ir užblokavus harmonikų generatoriaus išėjimo spinduliuotę porą minučių palaukti, kol kristalo temperatūra nusistovės. Tačiau mes radome kitą alternatyvų būdą, kaip sutrumpinti laiką, per kurį UV spinduliuotės galia pasiekia nuostovią vertę. Jis bus aptartas 2.3 skyriuje.

Laikinės kristalo aušimo charakteristikos

Norėdami įvertinti kristalo temperatūros pasiskirstymo įtaką ketvirtosios harmonikos generavimo dinamikai, infraraudonųjų spindulių termokamera išmatavome temperatūros kitimą kristalui vėstant. Iš pradžių, harmonikų generatoriui veikiant optimaliu režimu ($\Delta\theta = 0$ mrad), buvo leista nusistovėti temperatūros balansui ketvirtosios harmonikos kristale. Po to, išjungus lazerio spinduliuotę, kristalui vėstant iki kambario temperatūros, buvo fiksuojami ketvirtosios harmonikos kristalo paviršiaus temperatūros skirstiniai. Lazerio spinduliuotės išjungimo metu užregistruotame kristalo vėsimo termografiniame vaizde matyti, kad kristalo temperatūra nėra vieninga: kristalo centre matyti karšta zona, o kristalo kraštai yra žymiai vėsesni (2.5 pav., a). Toks pasiskirstymas gali būti paprastai paaiškintas – mažo skersmens (1,5 mm) ketvirtosios harmonikos pluoštas generuoja šilumą mažame kristalo tūryje, o žymiai didesnio paviršiaus ploto periferija (kristalo apertūra 8 mm) veikia kaip rezervuaras, lėtai perduodantis šilumą aplinkai. Išjungus lazerio spinduliuotę, iš karštos centrinės kristalo dalies šiluma perduodama į vėsesnius kristalo kraštus, todėl kristalo centrinės dalies temperatūra greitai mažėja. Maždaug po 5 s temperatūros skirstinyje nebelieka išreikštos karštos centrinės zonos ir visas kristalas aušta tolygiai dėl šilumos mainų su aplinka (2.5 pav., a ir b). Reikia paminėti, kad kristalo ilgis yra žymiai mažesnis nei skersiniai jo matmenys (atitinkamai, 0,7 mm ir 8 mm), todėl šilumos persiskirstymas kristale gali būti nagrinėjamas kaip dvimatis procesas laikant, kad išilgai pluošto sklidimo krypties temperatūra nusistovi iškart. Aproximavus išmatuotus laikinius kristalo temperatūros skirstinius



2.5 pav. Ketvirtosios harmonikos BBO kristalo aušimas išjungus harmonikų generatorių kaupinančią lazerio spinduliuotę: a) temperatūros pasiskirstymas kristale laiko momentais $t = 0,00$ s, $t = 0,25$ s ir $t = 1,00$ s ir b) temperatūros pasiskirstymas skersai kristalo. Kristalo kraštai žymimi juodomis brūkšninėmis linijomis.

dviejų gėstančių eksponenčių suma (įskaitant ir nuolatinę dedamąją, kuri atitinka aplinkos temperatūrą) [123], buvo įvertintos vėsimos laiko konstantos $\tau_1 = 0,95$ s ir $\tau_2 = 8,83$ s. Pirmoji (τ_1) siejama su greitu skersiniu šilumos pernešimu kristale, o antroji (τ_2) – viso kristalo aušimu dėl šilumos mainų su aplinka.

Ketvirtosios harmonikos generavimo efektyvumas

Ketvirtosios harmonikos generavimo efektyvumas priklauso tiek nuo kristalo temperatūros (lūžio rodikliai n^o ir n^e paprastajai ir nepaprastajai bangoms priklauso nuo temperatūros), tiek nuo kristalo išderinimo kampo, tiek nuo antrosios harmonikos (kuri konvertuojama į ketvirtąją) impulso spektro pločio. Netiesinio kristalo kampinio fazinio sinchronizmo derinimo kreivė aprašo, kaip dažnio keitimo į ketvirtąją harmoniką efektyvumas priklauso nuo kristalo kampo esant pastoviai temperatūrai ir tam tikram antrosios harmonikos bangos ilgiui. Kadangi antrosios harmonikos impulso spektro plotis yra tik keli nanometrai, tokia siaurame diapazone fazinio sinch-

ronizmo kampas gali būti aproksimuojamas tiesine bangos ilgio funkcija. Todėl galime antrosios harmonikos impulso spektrą tiesiogiai susieti su fazinio sinchronizmo kampu. Tokiu atveju, ketvirtosios harmonikos generavimo efektyvumo priklausomybė nuo išderinimo kampo gali būti išreiškiamas kaip kristalo fazinio sinchronizmo kampinio derinimo kreivės bei antrosios harmonikos spektro sąsūka. Jeigu vienos iš šių kreivių kampinis juostos plotis yra žymiai didesnis nei kitos, tai jos forma ir nulems ketvirtosios harmonikos generavimo efektyvumo funkcijos pavidalą.

Teorinė netiesinio kristalo kampinio fazinio sinchronizmo derinimo kreivė aprašoma $\text{sinc}^2(\Delta k L/2)$ pavidalo funkcija, kur L – kristalo ilgis, Δk – fazinių greičių išderinimas. Esant mažiems fazinio sinchronizmo išderinimo kampams $\Delta\theta_{\text{PM}}(T)$, fazinių greičių išderinimas gali būti apytiksliai suskaičiuotas skleidžiant Δk Teiloro eilute fazinio sinchronizmo kampo $\theta_{\text{PM}}(T)$ aplinkoje ir paliekant tik pirmąjį skleidimo narį:

$$\Delta k(\theta) \approx \Delta k(\theta_{\text{PM}}(T)) + \left. \frac{\partial(\Delta k)}{\partial\theta} \right|_{\theta=\theta_{\text{PM}}(T)} \Delta\theta_{\text{PM}}. \quad (2.1)$$

Tariant, kad fazinių greičių išderinimas ties kritinio fazinio sinchronizmo kampu $\theta_{\text{PM}}(T)$ yra lygus nuliui, gauname:

$$\Delta k(\theta) = \left. \frac{\partial(\Delta k)}{\partial\theta} \right|_{\theta=\theta_{\text{PM}}(T)} \Delta\theta_{\text{PM}} = \gamma(T) \Delta\theta_{\text{PM}}, \quad (2.2)$$

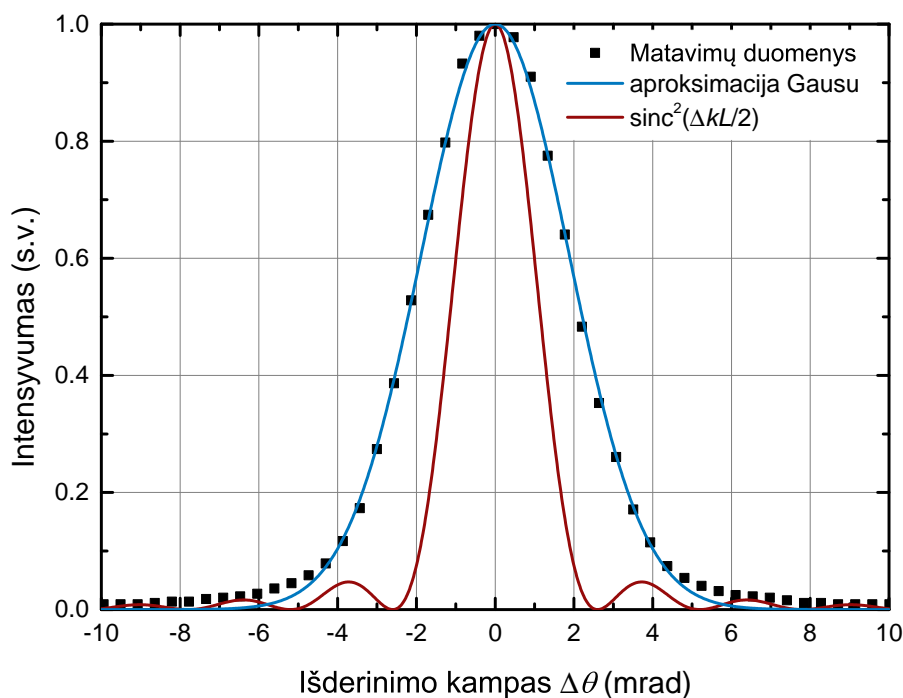
kur

$$\gamma(T) = \frac{2\pi}{\lambda_{2\omega}} (n_{2\omega}^o)^3 \left[\frac{(n_{4\omega}^o)^2 - (n_{4\omega}^e)^2}{(n_{4\omega}^o)^2 (n_{4\omega}^e)^2} \right] \sin(2\theta_{\text{PM}}(T)). \quad (2.3)$$

Čia $n_{2\omega}^o$ yra $\text{NK}_{4\omega}$ kristalo lūžio rodiklis paprastajai antrosios harmonikos spinduliuotės bangai, $n_{4\omega}^o$ ir $n_{4\omega}^e$ – atitinkami lūžio rodikliai ketvirtosios harmonikos spinduliuotės paprastajai ir nepaprastajai bangoms, $\lambda_{2\omega}$ yra antrosios harmonikos spinduliuotės bangos ilgis [124]. Kampinio fazinio sinchronizmo derinimo juostos plotis pusės maksimalaus intensyvumo aukštyje (FWHM) išreiškiamas kaip

$$\Delta\theta_{\text{FWHM}}(T) = \frac{5,568}{|\gamma(T)| L} \quad (2.4)$$

ir 0,7 mm ilgio ketvirtosios harmonikos BBO kristalui kambario temperatūroje yra apytiksliai lygus 2,3 mrad. Mūsų eksperimentuose naudotų femtosekundinių antrosios harmonikos impulsų spektras gali būti aproksimuojamas Gauso funkcija, kurios plotis pusės maksimalaus intensyvumo aukštyje yra



2.6 pav. Ketvirtosios harmonikos spinduliuotės intensyvumo priklausomybė nuo kristalo išderinimo kampo, esant pastoviai temperatūrai ir mažam kaupinimo spinduliuotės intensyvumui. Juodi taškai – matavimų duomenys, aproksimacija Gauso funkcija (mėlyna linija) ir apskaičiuota teorinė ketvirtosios harmonikos BBO kristalo kampinio fazinio sinchronizmo derinimo kreivė (raudona linija).

~ 2 nm. Atitinkamai, bangos ilgiui pakitus 1 nm ketvirtosios harmonikos fazinio sinchronizmo kampas netiesiniame BBO kristale pakinta $\sim 2,6$ mrad. Kadangi sinchronizmo kampų diapazonas femtosekundinio antrosios harmonikos impulso spektriniamis komponentams yra maždaug du kartus didesnis už kristalo sinchronizmo juostos plotį, ketvirtosios harmonikos intensyvumo priklausomybė nuo kristalo posūkio kampo savo pobūdžiu artimesnė antrosios harmonikos spektro formai – Gauso funkcijai. 2.6 pav. pateikta eksperimentiškai išmatuota ketvirtosios harmonikos intensyvumo priklausomybė nuo išderinimo kampo (juodi taškai), kai keitimo efektyvumas į ketvirtąją harmoniką yra mažas (t. y. šiluminiai reiškiniai neturi įtakos). Matavimo duomenis galima labai gerai aproksimuoti Gauso funkcija, kurios plotis pusės maksimalaus intensyvumo aukštyje yra $\Delta\theta_{\text{BW}} = 4,4$ mrad (mėlyna linija). Mūsų tirtu atveju BBO kristalo kampinio fazinio sinchronizmo derinimo kreivės (raudona linija) įtaka bendrai generavimo efektyvumo kreivei pastebima tik esant dideliame išderinimo kampui ($|\Delta\theta| > 5$ mrad).

2.2 Teorinis šiluminių reiškinių įtakos modeliavimas

Norėdami geriau paaiškinti išmatuotas netiesinio optinio dažnio keitiklio charakteristikas, sukūrėme matematinį modelį ketvirtosios harmonikos galios bei kristalo temperatūros laikinių priklausomybių teoriniam skaičiavimui. Pagrindinė modelio idėja yra ta, kad antrosios harmonikos keitimo efektyvumas į ketvirtąją priklauso ne tik nuo netiesinio kristalo sinchronizmo derinimo kampo, bet ir nuo kristalo temperatūros, nes lūžio rodikliai paprastajai (n^o) ir nepaprastajai (n^e) bangoms priklauso nuo temperatūros.

Atsižvelgdami į 2.6 pav. pateiktus ketvirtosios harmonikos keitimo efektyvumo matavimo rezultatus laikėme, kad efektyvumas aprašomas Gauso pavidalo fazinio sinchronizmo kreive ($\Delta\theta_{BW} = 4,4 \text{ mrad}$), kurios maksimumo padėtis priklauso nuo temperatūros. Modeliuojant buvo laikoma, kad, nepaisant temperatūros gradiento kristale, lazerio pluošto zonoje kristalo temperatūra T išlieka pastovi. Ketvirtosios harmonikos intensyvumo priklausomybė buvo aprašoma taip:

$$I_{IV}(\theta, T) = \eta I_{II} \exp\left(-\frac{4 \ln 2 (\theta - \theta_{PM}(T))^2}{\Delta\theta_{BW}^2}\right), \quad (2.5)$$

čia I_{IV} ir I_{II} – vidutiniai ketvirtosios ir antrosios harmonikos spinduliuočių intensyvumai, o $\eta = 0,39$ – eksperimentiškai išmatuotas maksimalus dažnio keitimo efektyvumas, kai tenkinamos fazinio sinchronizmo sąlygos. Pažymėsime, kad fazinio sinchronizmo kampas $\theta_{PM}(T)$ taip pat netiesiogiai priklauso nuo laiko, nes temperatūra yra laiko funkcija.

Remiantis išmatuotomis kristalo vėsimo charakteristikomis (2.5 pav.), šilumos perdavimas kristale gali būti aprašomas dviejų temperatūrų modeliu. Kristalas sąlyginai padalinamas į dvi zonas, centrinę ir periferinę. Centrinėje zonoje sugerta ketvirtosios harmonikos spinduliuotė virsta šiluma, o periferinė zona kaista tik dėl šilumos kiekio, pernešamo iš centrinės kristalo dalies. Šis procesas vyksta kelis kartus greičiau, nei kad šiluma iš kristalo atiduodama aplinkos orui. Šilumos perdavimą iš centrinės kristalo dalies, kurios temperatūra T , į T_p temperatūros periferiją bei viso kristalo aušinimą dėl šilumos mainų su aplinka (T_0) aprašo šilumos balanso lygtys:

$$\rho c_p \frac{dT}{dt} = \tau f (\alpha I_{IV}(\theta, T) + \beta I_{IV}^2(\theta, T)) - h_1 (T - T_p), \quad (2.6)$$

$$\rho c_p \frac{dT_p}{dt} = \frac{h_1}{\xi} (T - T_p) - h_2 (T_p - T_0), \quad (2.7)$$

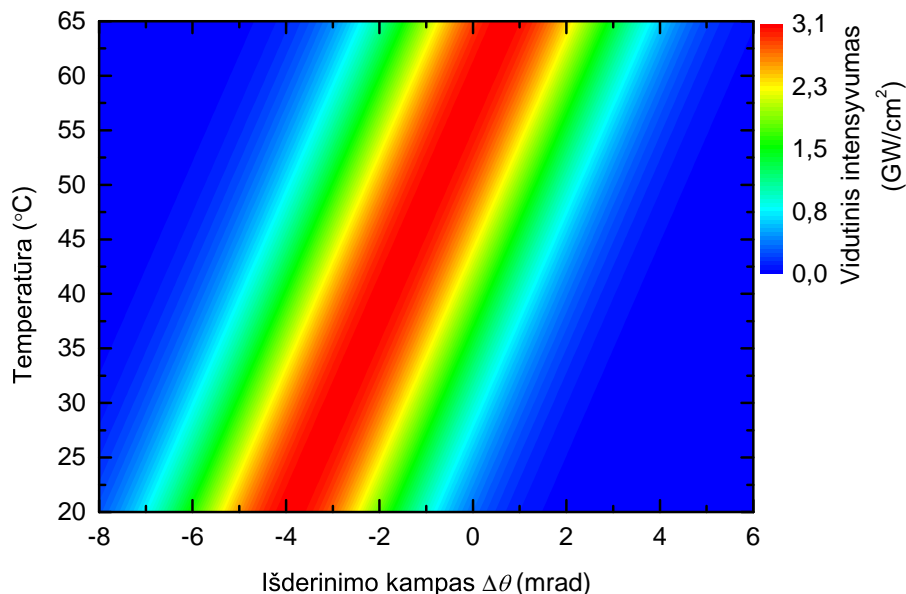
čia T_p ir T_0 žymi atitinkamai kristalo periferijos ir aplinkos temperatūras, α

2. Šiluminių reiškinių įtakos valdymas

ir β – santykiniai tiesinės ir dvifotonės sugerties koeficientai, ρ – BBO kristalo masės tankis, c_p – savitoji kristalo šiluminė talpa, τ – impulso trukmė, f – impulsų pasikartojimo dažnis. Koeficientai $h_1 = \frac{c_p \rho}{\tau_1}$ ir $h_2 = \frac{c_p \rho}{\tau_2}$ aprašo šilumos perdavimo spartą iš kristalo centro į periferiją ir iš periferijos į aplinką. Modeliuojant šilumos pernešimą, kristalo aušimo greitį nusakančių laiko konstantų τ_1 ir τ_2 vertės buvo paimtos iš kristalo aušimo aproksimavimo dviejų gėstančių eksponenčių suma. Koeficientas ξ nusako kristalo periferinės ir centrinės zonų tūrių santykį bei jų temperatūros pokyčius, kai maža centrinė dalis šildo didelę periferinę sritį (t. y. periferijos temperatūra nepakyla tiek pat, kiek sumažėja centrinės dalies temperatūra). Kadangi šis parametras tik atspindi dviejų temperatūrų modelio koncepciją, o ne realų temperatūros pasiskirstymą, jis buvo laisvai keičiamas modeliuojant temperatūrų ir ketvirtosios harmonikos spinduliuotės galios dinamikas. Taip pat laisvai buvo varijuojami santykiniai ketvirtosios harmonikos tiesinės (α) ir dvifotonės (β) sugerties koeficientai. Pažymėsime, kad čia naudojamos integralinės sugerties charakteristikos atspindi vidutinį tiesiškai ir dvifotoniškai sugeriamą spinduliuotės kiekį per visą kristalo ilgį ir neįskaito ketvirtosios harmonikos pluošto profilio bei to, kad ketvirtosios harmonikos intensyvumas netiesiškai priklauso nuo sklidimo atstumo kristale. Todėl šie parametrai savo vertėmis yra mažesni nei realūs tiesinės ir dvifotonės ketvirtosios harmonikos sugerties koeficientai. Ketvirtas laisvai varijuojamas parametras mūsų modelyje buvo koeficientas χ , nusakantis kaip fazinio sinchronizmo kampas $\theta_{PM}(T)$ priklauso nuo temperatūros:

$$\theta_{PM}(T) = \theta_{PM}(T_0) + \chi(T - T_0) \quad (2.8)$$

Diferencialinių lygčių sistema ((2.6) ir (2.7)) buvo skaitmeniškai sprendžiama Runge–Kutta metodu. Modeliavimo rezultatai buvo optimizuoti naudojant “Nelder–Mead simplex” [125] netiesinio optimizavimo algoritmą ir kiekvienoje jo iteracijoje lyginant diferencialinių lygčių sprendinius su matavimo rezultatais ir varijuojant keturis laisvuosius parametrus. Geriausiai su eksperimentiniais duomenimis sutampantys ketvirtosios harmonikos spinduliuotės galios bei kristalo temperatūros modeliavimo rezultatai pateikiami 2.2 pav. ir 2.3 pav. Ketvirtosios harmonikos generavimo efektyvumo priklausomybė nuo kristalo išderinimo kampo bei temperatūros atvaizduota 2.7 pav., kur spalvų skalė rodo sugeneruotos ketvirtosios harmonikos spinduliuotės intensyvumą. Modeliavimo rezultatai pakankamai gerai atkartoja matavimų rezultatus, o kartu ir patvirtina, kad mūsų aprašytas matematinis modelis gali būti naudojamas šiluminių procesų modeliavimui plonuose



2.7 pav. Sugeneruotos ketvirtosios harmonikos vidutinio intensyvumo I_{IV} priklausomybė nuo kristalo išderinimo kampo $\Delta\theta$ ir temperatūros.

optiniuose kristaluose su tiesine ir dvifotone sugertimi.

Optimizuotas laisvųjų parametrų vertes palyginome su atitinkamais fizikiniais parametrais, kurių vertės pateikiamos literatūroje. Iš teorinio modeliavimo gavome, kad optimalaus fazinio sinchronizmo kampo priklausomybė nuo temperatūros (2.7 pav.) yra žymiai stipresnė nei galima buvo tikėtis iš lūžio rodiklių n^o ($\lambda = 513$ nm) ir n^e ($\lambda = 257$ nm) teorinių temperatūrinių priklausomybių [122]. Apskaičiuotas fazinio sinchronizmo kampo pokytis, atsirandantis kristalo temperatūrai pakilus vienu laipsniu, yra $\chi_{\text{teor}} = 0,03$ mrad/°C, tuo tarpu iš modeliavimo gautas pokytis yra daugiau kaip tris kartus didesnis, $\chi = 0,10$ mrad/°C. Toks skirtumas galėjo atsirasti, jeigu reali temperatūra kristalo centre būtų buvusi gerokai didesnė, nei mūsų išmatuoti. Ši situacija yra labai tikėtina, nes temperatūros matavimams naudota IR kamera pagal paskirtį nėra pritaikyta mažų objektų temperatūros matavimams. Kameros erdvinė skyra (~ 1 mm) palyginama su pluošto skersmeniu (1,5 mm), todėl akivaizdu, kad pluošto centrinėje dalyje reali temperatūra turėjo būti didesnė, nei išmatuoti. Kita priežastis, dėl kurios sumodeliuota temperatūrinė fazinio sinchronizmo kampo priklausomybė galėtų išsikreipti bei nesutapti su teorine, tai temperatūrų gradiento susidarymas kristalo viduje lazerio pluošto sklaidimo kryptimi. UV spinduliuotės intensyvumas kristale auga pluošto sklaidimo kryptimi ir didžiausia netiesinė sugertis pasireiškia ties galiniu kristalo paviršiumi.

Atsižvelgiant į literatūroje pateikiamas vertes [122], absoliutus tiesinės sugerties koeficientas α netiesiniame BBO kristale ties ~ 265 nm turėtų bū-

2. Šiluminių reiškinių įtakos valdymas

ti intervale tarp $0,04\text{ cm}^{-1}$ ir $0,17\text{ cm}^{-1}$. Tariant, kad šios vertės galioja ir ties 257 nm , iš modeliavimo gauta santykinio tiesinės sugerties koeficiento vertė $\alpha = 0,52\text{ cm}^{-1}$ iškelia prielaidą, kad mūsų naudotame ketvirtosios harmonikos BBO kristale galėjo būti papildomų priemaišų, didinančių tiesinę sugertį. Tiesinė sugertis taip pat galėjo išaugti dėl trumpos gyvavimo trukmės defektų, kurie dažnai stebimi kituose optiniuose kristaluose [126–129].

Vertinant dvifotonę sugertį, mūsų modelyje nebuvo įskaitytas ketvirtosios harmonikos intensyvumo kitimas išilgai kristalo bei pluošto skirstinio įtaka. Todėl, kaip ir buvo tikėtasi, netiesinės sugerties egzistavimą įskaitančio parametro vertė $\beta = 0,18\text{ cm/GW}$ gauta kelis kartus mažesnė nei absoliuti BBO kristalo dvifotonės sugerties koeficiento vertė (literatūroje pateikiamos vertės ties 266 nm $0,47\text{ cm/GW}$ ir $0,93\text{ cm/GW}$ [122]). Mūsų modelyje laisvieji parametrai buvo varijuojami stengiantis modeliavimo rezultatus kuo geriau sutapatinti su išmatuotomis ketvirtosios harmonikos galios ir kristalo temperatūros dinamikomis, todėl optimizuota koeficiento β vertė taip pat yra tiesiogiai susieta su eksperimentiškai išmatuota kristalo temperatūra. Todėl jeigu reali kristalo temperatūra lazerio pluošto centre buvo didesnė už išmatuotąją (t. y. kristalo centre sugeneruojamas didesnis šilumos kiekis), tai ir dvifotonę sugertį aprašančio koeficiento β vertė turėtų būti proporcingai didesnė.

2.3 Motorizuotas fazinio sinchronizmo išderinimo kompensavimas

Iš 2.1 skyriuje pristatytų rezultatų matyti, kad šiluminiai efektai netiesiniame optiniame kristale sukelia lėtą ketvirtosios harmonikos galios kitimą laike, o tai apriboja praktines aukštesniųjų lazerio harmonikų taikymo galimybes. Tam, kad suvaldytume šiuos nepageidaujamus efektus ir sutrumpintume ketvirtosios harmonikos spinduliuotės galios nusistovėjimo laiką, pabandėme rasti optimalią netiesinio kristalo kampo keitimo funkciją, kuri kompensuotų fazinio sinchronizmo kampo kitimą augant kristalo temperatūrai.

Kaip buvo parodyta, kristalo aušimą išjungus lazerio spinduliuotę galima gerai aproksimuoti dviejų gėstančių eksponenčių suma, todėl pabandėme pritaikyti atvirkštinį variantą – šylančio kristalo fazinio sinchronizmo išderinimo kitimą kompensuoti keičiant kristalo posūkio kampą. Tam kristalo išderinimo kampą išreiškėme kaip:

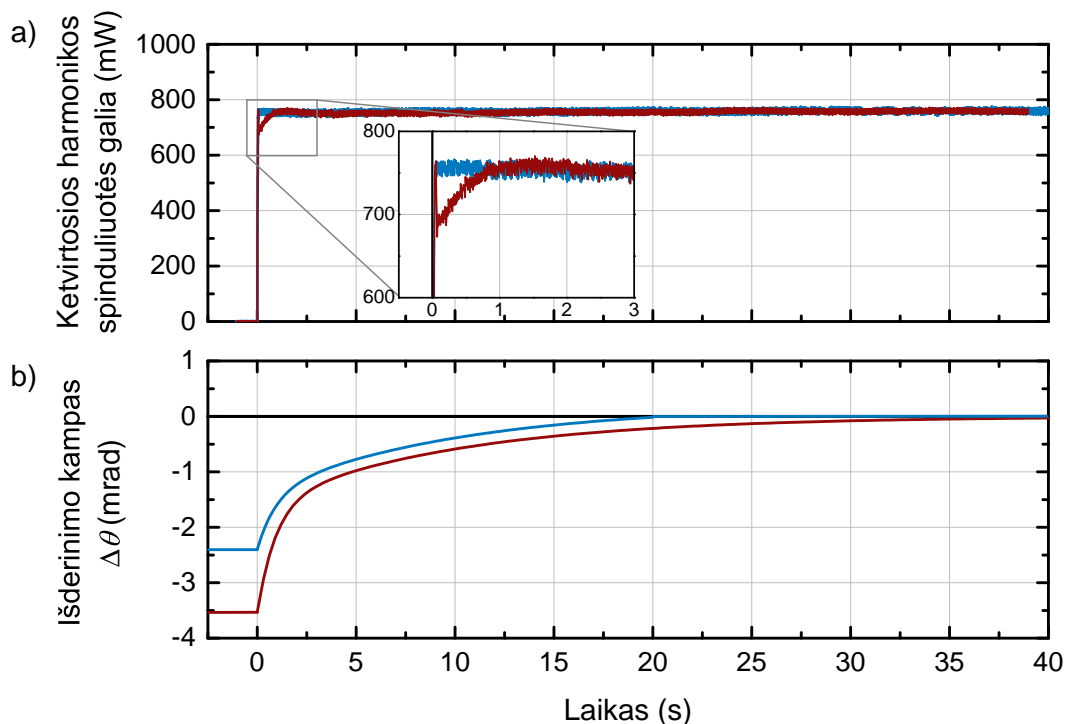
$$\Delta\theta(t) = Ae^{-\frac{t}{\tau_A}} + Be^{-\frac{t}{\tau_B}}. \quad (2.9)$$

Amplitudės (A ir B) ir laiko konstantos (τ_A ir τ_B) buvo surastos naudojant tą patį teorinį modelį, aprašytą skyrelyje 2.2, papildžius (2.5) lygtį laikine kristalo kampo priklausomybe, t. y. pakeitus θ į $\theta_0 + \Delta\theta(t)$. Pradinės sąlygos modelyje buvo parinktos taip, kad lazerio įjungimo momentu kristalo temperatūra yra lygi kambario temperatūrai $T(0) = T_0(0) = T_p(0) = 23,3^\circ\text{C}$, o ketvirtosios harmonikos kristalo posūkio kampas atitinka fazinio sinchronizmo sąlygą $\Delta\theta(0) = \theta(0) - \theta_0 = -3,56$ mrad. Tokiu atveju pradiniu laiko momentu sugeneruojama ketvirtos harmonikos galia turi būti maksimali (mūsų atveju $P_m = 760$ mW). Kristalo sukimo trajektorijos parametrai buvo optimizuoti siekiant išlaikyti pastovią sugeneruotos ketvirtosios harmonikos galią. Atsižvelgiant į modeliavimo rezultatus, idealiai stataus fronto galios užaugimas turėtų būti gautas, kai amplitudės $A = -1,96$ mrad ir $B = -1,60$ mrad, o laiko konstantos $\tau_A = 0,93$ s ir $\tau_B = 10,00$ s.

Pritaikius teoriškai optimizuotą trajektoriją ketvirtosios harmonikos spinduliuotės galios augimo greitį pavyko ženkliai padidinti: galia nusistovėjo ties maksimalia verte per pirmąsias dvi sekundes (2.8 pav., a, raudona linija). Palyginimui priminsime, kad be motorizuoto kampo valdymo galios nusistovėjimo laikas buvo ~ 100 s. Motorizuotai valdant kristalo posūkio kampą pirmosiomis sekundėmis po lazerio spinduliuotės įjungimo ketvirtosios harmonikos galios nuokrypis neviršijo 12 % maksimalios vertės. Praėjus 40 s nuo lazerio spinduliuotės įjungimo, motorizuotas kristalo sukimas buvo sustabdytas pasiekus optimalią kristalo poziciją θ_0 . Tačiau verta pastebėti, kad daugiau nei pusė viso valdymo laiko ($20\text{ s} < t < 40\text{ s}$) buvo neefektyviai naudojama lėtam kristalo pozicijos derinimui netoli optimalaus kristalo kampo θ_0 , kur ketvirtosios harmonikos galia beveik nekinta (2.3 pav., a, $0\text{ mrad} > \Delta\theta > -0,5\text{ mrad}$). Todėl motorizuoto valdymo laikas iš esmės gali būti efektyviai sutrumpintas atitinkamai modifikavus kristalo kampo keitimo funkciją (pvz. papildžius kristalo sukimo funkciją (2.9) nuolatine dedamąja, o variklio judėjimą sustabdžius iš karto, kai tik pasiekiamą optimali pozicija).

Išmatuota ketvirtosios harmonikos galios dinamika (2.8 pav.) taip pat parodė, kad mūsų tirtose sistemoje egzistuoja labai greiti procesai, kurių mes neįskaitėme teoriniame modelyje. Pirmąsias ~ 70 ms po lazerio spinduliuotės įjungimo ketvirtosios harmonikos galia staigiai krinta, po to per ~ 2 s pasiekiamą maksimali galia (2.8 pav., a, raudona linija įterptiniame grafike). Greitas galios sumažėjimas gali būti siejamas su temperatūros gradientų for-

2. Šiluminių reiškinių įtakos valdymas



2.8 pav. Temperatūrinės fazinio sinchronizmo kampo priklausomybės kompensavimas valdant kristalo išderinimo kampą laike: a) išmatuota ketvirtosios harmonikos galios priklausomybė nuo laiko po lazerio spinduliuotės įjungimo ir b) funkcija, pagal kurią buvo keičiamas kristalo išderinimo kampas.

mavimusi kristale skersai ir išilgai lazerio pluošto sklidimo krypties. Deja, šios hipotezės patikrinti negalėjome, nes mūsų turimų matavimo priemonių laikinė (keliasdešimt milisekundžių) ir erdvinė (~ 1 mm) skyros buvo nepakankamos. Greitų šiluminių procesų egzistavimas (šilumos sklidimas išilgai kristalo bei skersinis šilumos pasiskirstymas lazerio pluošto zonoje) taip pat paaikšintų matavimų bei modeliavimo rezultatų, pavaizduotų 2.3 pav., b, nesutapimą. Kaip matyti iš 2.3 pav., b grafiko, eksperimentiškai išmatuoti laiko intervalai (ištiesinė linija), per kuriuos pasiekama maksimali galios vertė esant dideliems kristalo kampo išderinimams ($\Delta\theta < -2$ mrad), yra trumpesni nei gaunami iš modeliavimo rezultatų (brūkšninė linija).

Labai tikėtina, kad ketvirtosios harmonikos galios stabilumą galima dar labiau pagerinti papildžius kristalo sukimo funkciją (2.9) trečiu greitai gėstančiu eksponentiniu nariu, kompensuojančiu labai greitus šiluminius efektus, susijusius su šilumos perdavimu išilgai kristalo. Visgi mes radome alternatyvų būdą, kuris leidžia pagerinti ketvirtosios harmonikos startavimo charakteristikas nepridedant papildomo eksponentinio nario. Tariant, kad pradiniai šiluminiai reiškiniai yra labai greiti, galima parinkti mažesnę pradinį kristalo išderinimo kampą $\Delta\theta$ (kartu sumažinant variklio greitį) taip,

kad greitai auganti kristalo temperatūra per keliasdešimt milisekundžių „pasiųtytų“ fazinį sinchronizmą. Stengiantis pagerinti ketvirtosios harmonikos spinduliuotės galios nusistovėjimo charakteristikas bei sutrumpinti motorizuoto valdymo trukmę, buvo parenkama (2.9) lygties amplitudė A bei motorizuoto valdymo trukmę trumpinanti papildoma nuolatinė dedamoji. Iš modeliavimo rezultatų gautos τ_A , τ_B bei amplitudė B vertės nebuvo keičiamos. Geriausi ketvirtosios harmonikos startavimo rezultatai buvo gauti, kai $A = -1$ mrad, o nuolatinė dedamoji 0,2 mrad (2.8 pav., mėlynos linijos). Šiuo atveju maksimali galia pasiekama per 50 ms, o visas motorizuotas kristalo kampo valdymas trunka 20 s.

2.4 Rezultatų aptarimas

Buvo ištirta didelio impulsų pasikartojimo dažnio (50 kHz) aIR spinduliuotės femtosekundiniu lazeriu kaupinamo ketvirtosios harmonikos modulio startavimo dinamika. Įjungus lazerio spinduliuotę, ketvirtosios harmonikos galios savaiminis nusistovėjimas trunka keliasdešimt sekundžių ir yra tiesiogiai siejamas su šiluminiais reiškiniais ketvirtosios harmonikos kristale. Dėl tiesinės ir netiesinės UV spinduliuotės sugerties netiesiniame optiniame kristale, didėja kristalo temperatūra, o kartu keičiasi fazinio sinchronizmo sąlygos. Tai neigiamai veikia UV generatoriaus spinduliuotės galios nusistovėjimo charakteristikas. Šiluminių reiškinų įtaka gali būti smarkiai sumažinta keičiant šylančio kristalo fazinio sinchronizmo derinimo kampą laike. Po kaupinimo spinduliuotės įjungimo, kristalui kaistant, optimali kristalo posūkio kampo priklausomybė nuo laiko randama pasinaudojant kristalo aušimo laikinėmis charakteristikomis. Iš kristalo aušimo dinamikos randamos charakteringos vėsimo trukmės, nusakančios šilumos atidavimo aplinkai bei šaltesniems kristalo kraštams spartas. Šios charakteringos trukmės tiesiogiai priklauso nuo kristalo šiluminio laidumo, kristalo geometrijos ir tvirtinimo būdo bei UV pluošto charakteristikų – skersmens ir intensyvumo skirstinio. Žinant juos, nesunkiai randama ir optimali kristalo sinchronizmo kampo valdymo laikinė funkcija.

Mūsų sukurtas modelis gali būti taikomas ne tik BBO, bet ir kitų netiesiniuose optiniuose dažnio keitikliuose naudojamų kristalų šiluminių reiškinų valdymui. Pagrindinės medžiagos charakteristikos, kurias reikia rasti (arba apskaičiuoti) – tai šilumos perdavimo greitis kristale statmenai pluošto sklaidimo krypties bei kristalo kaitimą nusakantys sugerties koeficientai.

Šiame darbe pateiktas teorinis modelis gerai aprašo šiluminius mainus

2. Šiluminių reiškinių įtakos valdymas

standartiniuose didelės, kelis kartus didesnės nei pluošto skersmuo, apertūros ir plonuose (iki 1 mm storio) ultratrumpųjų impulsų generavimui naudojamuose netiesiniuose kristaluose. Norint modeliuoti šiluminių reiškinių įtaką ilgesniuose pikosekundiniams ar nanosekundiniams impulsams generuoti skirtuose kristaluose, būtina į (2.6) ir (2.7) lygtis įvesti šilumos sklaidimą išilgai kristalo aprašančius narius. Taip pat, norint įvertinti šiluminių reiškinių įtaką UV spinduliuotės generavimo dinamikai kai naudojamas didelio skersmens kaupinimo pluoštas, reikėtų atsižvelgti į tai, kaip dėl temperatūros gradiento kinta sinchronizmo sąlyga radialine pluošto kryptimi.

Generuojant didelio pasikartojimo dažnio ($f > 20$ kHz) ir didelės vidutinės galios ($P > 1$ W) UV spinduliuotės impulsus kartais šiluminių procesų įtaka gali būti tokia didelė, kad be motorizuoto kristalo kampo valdymo iš viso būtų neįmanoma pasiekti maksimalaus keitimo efektyvumo. Tokiu atveju, po kaupinimo spinduliuotės įjungimo, kambario temperatūros netiesiniame optiniame kristale pradinis fazinio sinchronizmo išderinimas būna per didelis, o pradinės UV spinduliuotės intensyvumas – per mažas tam, kad būtų inicijuotas reikšmingas kristalo temperatūros augimas.

Kartais motorizuotas valdymas reikalingas iš karto dviejų kristalų fazinio sinchronizmo kampo derinimui. Tokio atvejo pavyzdys – penktosios femtosekundinio Yb:KGW lazerio harmonikos generatorius. Tada penktosios harmonikos netiesinio kristalo aušimo charakteristikos matuojamos prieš tai optimizavus ketvirtosios harmonikos kristalo fazinio sinchronizmo kampo derinimą. Šiuo atveju kristalų kampų derinimas turi būti griežtai sinchronizuotas laike bei naudojamos papildomos grįžtamąjį ryšį užtikrinančios priemonės. Vienas iš būdų realizuoti grįžtamąjį ryšį – netiesiogiai stebėti generatoriaus išėjimo galią matuojant nekonvertuotos kaupinimo spinduliuotės galios pokytį.

3 skyrius

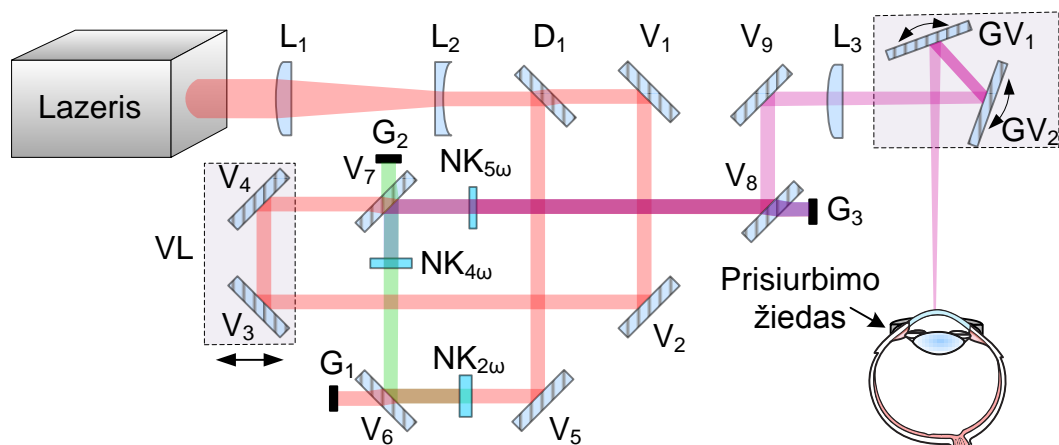
Ragenos abliacija femtosekundiniais UV impulsais

Šiuolaikinėje lazerinėje refrakcinėje chirurgijoje ragenos stromos gaubtumas koreguojamas naudojant stipriai ragenoje sugeriamus nanosekundinius UV srities impulsus [86,108]. Tam taikomi eksimerinio ArF lazerio (193 nm) arba kietakūnių lazerių aukštesniųjų harmonikų (210–213 nm) impulsai. Mūsų tyrimuose ragenos audinių abliacija atliekama naudojant femtosekundinio kietakūnio Yb:KGW lazerio penktosios harmonikos 205 nm impulsus, šis bangos ilgis yra tarp komercinių ArF eksimerinių ir kietakūnių lazerinių sistemų bangos ilgių.

3.1 Femtosekundinė lazerinė sistema

Ragenos abliacijos tyrimams naudoto penktosios Yb:KGW femtosekundinio lazerio harmonikos (205 nm) generatoriaus principinė optinė schema pavaizduota 3.1 pav. Teleskopu, sudarytu iš lęšių L_1 (lęšio židinio nuotolis $F_1 = +250$ mm) ir L_2 ($F_2 = -65$ mm), lazerio pluošto skersmuo sumažinamas nuo 6 mm iki 1,6 mm ($1/e^2$ maksimalaus intensyvumo lygyje). Dalikliu D_1 , kurio atspindžio koeficientas $R = 65$ %, spinduliuotė padalinama į dvi dalis. Didesnio intensyvumo spinduliuotės dalis, atspindėta nuo daliklio D_1 , naudojama antrosios harmonikos (513 nm) generavimui netiesiniame BBO kristale $NK_{2\omega}$. Keitimo efektyvumas į antrąją harmoniką siekia 65 %. Netiesiniame kristale $NK_{4\omega}$ antrosios harmonikos spinduliuotė konvertuojama į ketvirtąją (257 nm), pasiekiant 27 % keitimo efektyvumą (įvertinta pagal pradinę fundamentinės 1026 nm spinduliuotės galią). Ketvirtosios harmo-

3. Ragenos abliacija



3.1 pav. Penktosios harmonikos generavimo principinė optinė schema. L_1 – L_3 – lęšiai, D_1 – daliklis, V_1 – V_9 – dielektriniai veidrodžiai, $NK_{2\omega}$ – $NK_{5\omega}$ – netiesiniai BBO kristalai, VL – vėlinimo linija, GV_1 , GV_2 – galvanometriniai veidrodėliai, G_1 – G_3 – gaudyklės.

nikos spinduliuotės dažnis kolineariai sumuojamas su likusia fundamentinės spinduliuotės dalimi netiesiniame penktosios harmonikos kristale $NK_{5\omega}$. Optimalus laikinis ketvirtosios harmonikos ir fundamentinės spinduliuotės impulsų persiklojimas penktosios harmonikos kristale parenkamas keičiant vėlinimo linijos VL padėtį. Sugeneruota penktosios harmonikos spinduliuotė atspindima dielektriniais veidrodžiais, o visa dažnio konvertavimui nepanaudota ir pro dielektrinius veidrodžius V_6 – V_8 praėjusi spinduliuotė patenka į gaudykles G_1 – G_3 . Lazeriui veikiant 50 kHz impulsų pasikartojimo dažniu ir esant 5 W fundamentinės spinduliuotės galiai, sugeneruotos penktosios harmonikos vidutinė galia siekia 470 mW ir atitinka $9,4 \mu\text{J}$ impulso energiją. Spinduliuotės dažnio keitimo efektyvumas iš fundamentinės į penktąją harmoniką siekia 9,4 %.

Keičiant lazerio impulsų pasikartojimo dažnį bei norint užtikrinti didelį penktosios harmonikos generavimo efektyvumą, reikia išlaikyti optimalų spinduliuotės intensyvumą netiesiniuose kristaluose, t. y. tinkamai parinkti teleskopo (sudaryto iš L_1 ir L_2 lęšių) mažinimą arba didinimą. Keisdami lazerio impulsų pasikartojimo dažnį nuo 5 kHz iki 70 kHz bei parinkdami pluošto skersmenį visame dažnių diapazone sugebėjome išlaikyti 8–10 % keitimo efektyvumą. Kaip buvo minėta 2 skyriuje, didinant impulsų pasikartojimo dažnį, didėja šiluminių reiškinių įtaka harmonikų generatoriaus išėjimo charakteristikoms, todėl naudoti didesnę nei 70 kHz impulsų pasikartojimo dažnį tampa nebetikslinga.

Lazerio impulsai ragenos paviršiuje buvo skenuojami naudojant galvanometrinius veidrodėlių skenerius „hurrySCAN II 7“ („Scanlab“, Vokietijai).

ja). Galvanometrinių veidrodėlių skenerių padėtys ir lazerio impulsai buvo valdomi naudojant kompiuterinę PCI sąsajos plokštę RTC[®]5 („Scanlab“, Vokietija). Pagal į RTC[®]5 plokštę siunčiamas kompiuterines komandas generuojami skaitmeniniai signalai, nurodantys veidrodžių padėtis. Šie signalai galvanometrinių veidrodžių valdikliuose verčiami į analogines įtampas ir sustiprinami. Generuojamos galvanometrų valdymo srovės pagal nurodytas padėtis bei valdomas padėties nustatymo grįžtamasis ryšys. Atgal į RTC[®]5 plokštę gražinami skaitmeniniai veidrodžių padėties grįžtamojo ryšio signalai. Visos galvanometrinių skenerių ir lazerinės sistemos valdymo programos buvo parašytos LabView programavimo aplinkoje, naudojant gamintojo pateiktas dinamines bibliotekas.

Refrakcinės korekcijos procedūros principai naudojant didelio impulsų pasikartojimo dažnio ($f \approx 50$ kHz) femtosekundinį lazerį techniniu požiūriu skiriasi nuo procedūros, atliekamos standartine eksimerine ArF lazerine sistema. Kadangi eksimerinių lazerių spinduliuotė nepasižymi gera pluošto kokybe, norimo (plokščios viršūnės, Gauso arba supergausinio) intensyvumo skirstinio pluoštas suformuojamas naudojant specialius pluošto formuotuvus [130]. Ragenos paviršiaus gaubtumo modifikavimui naudojamų eksimerinių ArF lazerių pluoštas yra pakankamai didelis – nuo 0,6 mm iki 6,5 mm skersmens. Maksimalus eksimerinių lazerinių sistemų impulsų pasikartojimo dažnis siekia tik 1050 Hz [90]. Dėl šių spinduliuotės charakteristikų susiformavo ir eksimerinių sistemų pluošto valdymo bendrieji principai: mažas impulsų pasikartojimo dažnis leidžia greitais galvanometriniais skeneriais kiekvieną lazerio impulsą nukreipti į skirtingą ragenos paviršiaus vietą taip, kad gretimi laike lazerio impulsai nepersiklotų ant ragenos paviršiaus ir rageną kuo mažiau kaistų [131–134].

Deja, standartinės eksimerinių lazerių pluošto valdymo technikos negalima tiesiogiai pritaikyti keliasdešimt kilohercų impulsų pasikartojimo dažniu veikiančiai femtosekundinei lazerinei sistemai. Atliekant regos korekcijos operacijas lazerio pluoštas skenuojamas 5–8 mm skersmens zonoje, todėl norint laisvai valdyti kiekvieno impulso padėtį visoje abliacijos zonoje, reikėtų lazerio pluoštą skenuoti maždaug 500 m/s greičiu. Atsižvelgiant į tai, kad impulsai ragenos paviršiuje turi būti pozicionuojami itin tiksliai (mikrometrų tikslumu), toks didelis skenavimo greitis įprastiniams galvanometriniais skeneriais nėra pasiekiamas. Tačiau individualiai valdyti kiekvieno impulso padėtį nėra būtina, nes femtosekundinio lazerio penktosios harmonikos pluošto skersmuo ($\sim 100 \mu\text{m}$), o kartu ir vieno impulso ragenoje sugeneruotas nepageidaujamas šilumos kiekis, yra žymiai mažesnis nei komercinių

3. Ragenos abliacija

ArF eksimerinių lazerinių sistemų. Todėl galima sukurti alternatyvų pluošto valdymo algoritmą, kuris užtikrintų kontroliuojamą paviršiaus abliaciją ir minimalų ragenos kaitimą bei nekeltų itin aukštų reikalavimų galvanometrinių skenerių greičiui. Be to, naudojant mažo skersmens femtosekundinio lazerio pluoštelį galima pasiekti žymiai didesnę abliacijos skiriamąją gebą, nei naudojant didelio skersmens eksimerinio lazerio pluoštą.

Formuojant refrakcijos pokytį lazerio pluoštas turi būti tiksliai valdomas ragenos paviršiuje. Lazerio pluošto judėjimo trajektorija valdoma taip, kad skirtingose ragenos paviršiaus vietose būtų pašalinamas reikiamas audinio kiekis. Lazeriniame apdirbime medžiagos paviršiaus modifikavimui dažniausiai naudojama standartinė pluošto valdymo ir fokusavimo konfigūracija – pluoštas skenuojamas prieš fokusuojantį lęšį [129]. Galvanometriniai veidrodėliai nukreipia kolimuotą lazerio pluoštą užduotu kampu erdvėje, o iškart už jų statomas objektyvas, kurio židinio plokštumoje skenuojama sufokusuota pluošto dėmelė. Siekiant kompensuoti sferines ir lauko kreivumo aberacijas, paprastai naudojami plokščio lauko arba f -theta objektyvai. Tačiau jei skenavimas vyksta mažu kampu, tinka ir paprastas singletinis lęšis arba sferinis veidrodis. Jeigu fokusuojančio lęšio židinio nuotolis didelis (keliasdešimt centimetrų), lęšį galima patalpinti ir prieš galvanometrinius veidrodėlių skenerius. Mūsų atliktuose abliacijos eksperimentuose femtosekundiniai UV impulsai buvo fokusuojami naudojant didelio židinio nuotolio (250–750 mm) singletinius lęšius (arba sferinius veidrodžius), patalpintus prieš galvanometrinius veidrodėlių skenerius.

Femtosekundinio UV pluošto valdymą ir fokusavimą apsunkina tai, jog daugelis įprastų optinių elementų gamybai naudojamų medžiagų nėra visiškai skaidrios UV srityje. Dėl šios priežasties projektuojant optines schemas femtosekundinių UV impulsų taikymams vengiama naudoti skaidrius optinius elementus (lęšius, optinius langelius) ir stengiamasi, kur įmanoma, juos pakeisti atspindinčiais ir lėčiau degraduojančiais optiniais elementais – veidrodžiais. Modelinių medžiagų abliacijos eksperimentuose (kurie aprašomi 3.2 skyriuje) bei pirmuosiuose *in vivo* ragenos abliacijos tyrimuose UV spinduliuotės fokusavimui naudojome kvarcinius, MgF_2 arba CaF_2 singletinius lęšius. Tačiau dėl daugiafotonės sugerties UV srityje bei pastebimo minėtų medžiagų degradavimo, fokusuojantį lęšį vėliau pakeitėme sferiniu veidrodžiu. Pluošto fokusavimui naudojant sferinius veidrodžius, būtina užtikrinti, kad šviesa į veidrodį kristų mažu kampu ir atsiradęs astigmatizmas nedarytų didelės įtakos abliacijos kokybei. Mūsų eksperimentuose didžiausias kampas, kuriuo lazerio pluoštas krito į sferinį veidrodį ($f = +250$ mm),

buvo $4,2^\circ$. Išmatavę sufokusuoto pluošto intensyvumo skirstinį ties abliuojamu paviršiumi gavome, kad pluošto eliptiškumas yra 1,05.

Dielektrinių veidrodžių dangos garinamos konkrečiam bangos ilgiui, todėl veidrodis papildomai veikia kaip iš dalies atrankus bangos ilgiui optinis elementas. Pavyzdžiui, penktosios harmonikos dielektrinis veidrodis gerai atspindi netiesiniame kristale sugeneruotos penktosios harmonikos spinduliuotę, o nekonvertuotų fundamentinės ir ketvirtosios harmonikos spinduliuočių atspindžio koeficientai siekia vos kelis procentus. Todėl atsispindėjusi nuo kelių dielektrinių veidrodžių spinduliuotė efektyviai išfiltruojama.

UV srities dielektriniai veidrodžiai taip pat turi nemažus nuostolius. Pavyzdžiui, 205 nm bangos ilgiui skirtas veidrodis atspindi apie 98 % kritusios spinduliuotės. Todėl norint efektyviai panaudoti sugeneruotą UV spinduliuotę, net ir naudojant vien tik atspindinčius optinius elementus reikia stengtis, kad jų skaičius optinėje schemoje būtų kuo mažesnis.

Refrakcinių regos ydų korekcijos principai. Formuojant refrakcijos pokytį, didžiausias ragenos sluoksnio, kurį reikia pašalinti, storis randamas iš formulės:

$$\Delta y_m = R_i - R_f + \frac{R_i R_f}{R} \sin \left(\arcsin \left(\frac{R}{R_i} \right) - \arcsin \left(\frac{R}{R_f} \right) \right), \quad (3.1)$$

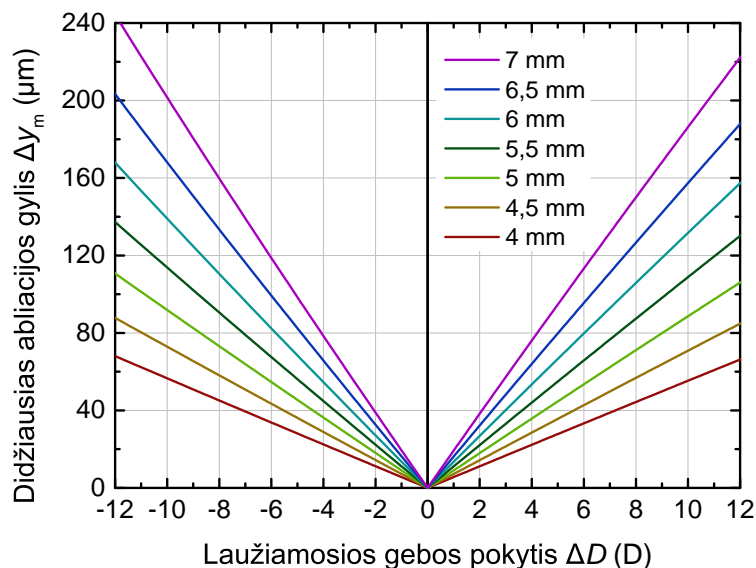
čia R_i ir R_f – atitinkamai pradinis ir galutinis ragenos kreivumo spindulys, o R – abliacijos zonos spindulys. Žinant pradinį ragenos kreivumo spindulį R_i ir norint rasti, koks turi būti kreivumo spindulys po abliacijos R_f , reikia pasinaudoti plonojo lęšio formule:

$$\Delta D = (1 - n) \left(\frac{1}{R_i} - \frac{1}{R_f} \right), \quad (3.2)$$

čia n – ragenos lūžio rodiklis. Šiame darbe visuose skaičiavimuose naudojome vidutinę žmogaus ragenos lūžio rodiklio vertę $n = 1,376$ [38, 41], bei darėme prielaidą, kad galutinis ragenos kreivumo spindulys lygus normalios žmogaus ragenos vidutiniam kreivumui, t. y. $R_f = 7,7$ mm [38, 135].

Naudojantis formulėmis (3.1) ir (3.2) apskaičiuotos didžiausios abliacijos gylis Δy_m priklausomybės nuo laužiamosios gebos pokyčio ΔD esant skirtingoms abliacijos zonos skersmens vertėms, pavaizduotos 3.2 pav. Į kairę nuo nulio – trumparegystės korekcija, į dešinę – toliaregystės. Iš 3.2 pav. matyti, kad abliacijos gylis (o taip pat ir ragenos stromos, kurią reikia pašalinti, tūris), auga didėjant laužiamosios gebos pokyčiui ir/arba abliacijos

3. Ragenos abliacija

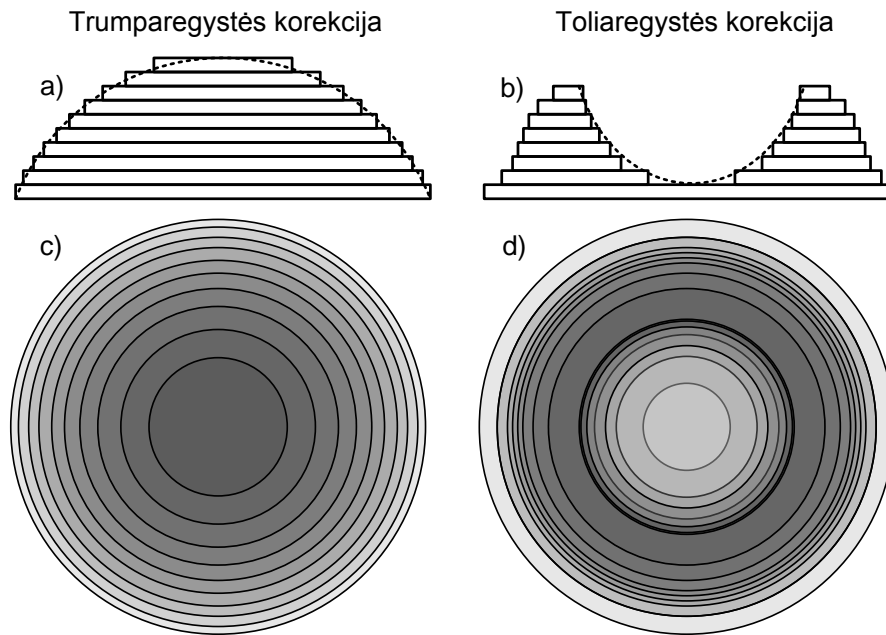


3.2 pav. Didžiausio abliacijos gylis priklausomybė nuo suformuoto laužiamosios gebos pokyčio, kai abliacijos zonos skersmuo kinta nuo 4 mm iki 7 mm (žr. legendą).

zonos skersmeniui. Todėl praktiškai optimalus abliacijos zonos dydis parenkamas atsižvelgiant į paciento vyzdžio skersmenį, centrinę ragenos storį bei numatytą laužiamosios gebos pokytį. Taip pat reikia paminėti, kad tikrasis abliacijos gylis dažniausiai būna didesnis nei apskaičiuojamas pagal (3.1) formulę. Jis priklauso nuo to, kokia gali būti pasiekta erdvinė abliacijos skyra naudojant konkrečią lazerinę sistemą (t. y. koks vienu impulsu sukuriama ragenos kraterio plotas ir gylis bei koks naudojamo lazerio pluošto profilis). Tam, kad būtų užtikrintas reikiamas sferinis refrakcijos pokytis tam tikro skersmens optinėje zonoje, formuojama papildoma pereinamoji zona atsižvelgiant į lazerio pluošto parametrus. Ši zona auga didėjant pluošto skersmeniui, dėl to proporcingai auga bendras abliacijos gylis. Refrakcinėje chirurgijoje mažas abliuojančio pluošto skersmuo laikomas privalumu, nes refrakcijos pokytis suformuojamas pašalinant minimalų ragenos audinio tūrį, o didelė abliacijos skyra suteikia galimybę koreguoti aukštesnių eilių aberacijas [136].

Formuodami refrakcijos pokytį dešimčių kilohercų dažnio femtosekundiniais impulsais naudojome rastrinį¹ lazerio pluošto skenavimo būdą. Atsižvelgiant į lazerio impulsų pasikartojimo dažnį bei pluošto skersmenį sąsmaukoje, pluošto skenavimo greitis bei atstumas tarp rastro linijų buvo parenkamas taip, kad pavieniais impulsais suformuotos duobutės iš dalies persiklotų ir būtų pašalinamas tolygus medžiagos sluoksnis. Žinant šio vie-

¹Abliuojamame plote lazerio impulsai yra išdėstomi tvarkingomis linijomis



3.3 pav. Trumparegystės (a – skerspjūvis, c – vaizdas iš viršaus) ir toliaregystės (b – skerspjūvis, d – vaizdas iš viršaus) koregavimas šalinant ragenos audinį vienodo storio sluoksniais. Tamsesnė spalva žymi didesnę pašalinamos ragenos kiekį.

nu rastriniu skenavimu pašalinto sluoksnio storį, galima apskaičiuoti, kiek ir kokios formos sluoksnių reikia, kad būtų suformuotas norimas regos ydą koreguojantis erdvinis darinys. Trumparegystės korekcijos atveju, darinys, kurį reikia pašalinti, yra išgaubto lęšio formos. Todėl daugiausiai audinio reikia pašalinti ragenos centre, o mažiausiai – periferijoje. 3.3 pav. pavaizduotas trumparegystės korekciją atitinkančios figūros, sudalintos į vienodo storio sluoksnius, skersinis pjūvis (a) ir vaizdas iš viršaus (c). Toliaregystės korekcija atliekama šalinant skirtingo vidinio ir išorinio diametro žiedo pavidalo sluoksnius. Figūros, kurią reikia pašalinti toliaregystės atveju, išskaidymo į sluoksnius pavyzdys pateiktas 3.3 pav., b ir d dalyse.

3.2 *Ex vivo* ragenos ir modelinių medžiagų abliacija

Paviršiaus abliacijos tyrimams buvo naudojami didele UV spinduliuotės sugertimi pasižymintys bandiniai – PMMA, želatina ir *ex vivo* kiaulių ragenos [137,138]. Šių tyrimų metu rasti optimalūs modelinių medžiagų abliacijos parametrai bei išbandytos refrakcinės chirurgijos procedūrų metodikos vėliau buvo pritaikytos *in vivo* triušių ragenos abliacijai.

Chemiškai grynos želatinos („Carl Roth“, Vokietija) bandiniai buvo ruošiami ištirpinant 15 g želatinos miltelių karštame ($\sim 80^{\circ}\text{C}$) distiliuotame

3. Ragenos abliacija

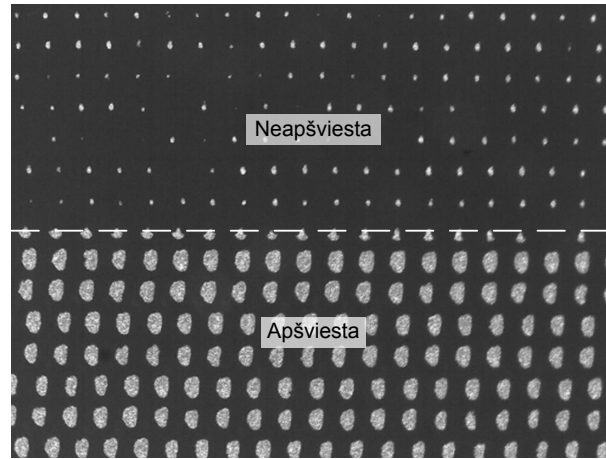
vandenyje, 80 ml tūryje. Koloidinis ištirpintos želatinos tirpalas buvo išliejamas į pasiruostą liejimo formą ir atšaldomas iki 4 °C temperatūros, kad sustingtų. Liejimo forma buvo pagaminta iš dviejų objektinių mikroskopo stikliukų, paliekant 2 mm tarpą tarp jų. Prieš atliekant abliacijos bandymus vienas stiklas būdavo atsargiai pašalinamas – taip gaunamas skaidrus ir lygus (optinės kokybės) želatinos paviršius. Antrasis (apatinis) stiklas paliekamas tam, kad būtų išlaikyta plono želatinos bandinio forma.

Ex vivo kiaulių akių obuoliai buvo gaunami iš UAB „Cesta“. Akys po ekscizijos buvo laikomos fiziologiniame tirpale, 4 °C temperatūroje. Visi eksperimentai buvo atlikti ne vėliau kaip per 24 h po gyvūnų numaravimo. Prieš eksperimentus ragenos epitelio sluoksnis buvo mechaniškai nuvalomas naudojant chirurginę mentelę. Reikiamas akispūdis užtikrinamas į akies obuolį per sklerą arba optinį nervą suleidžiant fiziologinio tirpalo. Akis dedama į specialų laikiklį, kuris fiksuoja akies ragenos padėtį.

Modelinių medžiagų ir *ex vivo* ragenų paviršiaus parametrai buvo charakterizuojami optinių paviršių konfokaliu profilometru „PLμ2300“ („Sensofar“, Ispanija) ir optiniu šviesaus lauko mikroskopu „Crystal-Pro 5424“ („Konus“, Italija).

3.2.1 PMMA abliacija

PMMA – pigi ir lengvai prieinama medžiaga, puikiai tinka skenavimo algoritmų analizavimui bei palyginimui. PMMA paviršiuje suformuotų darinių forma nekinta, todėl galima atlikti įvairius ilgai trunkančius matavimus, pvz. didelės zonos profilio matavimą optiniu profilometru, abliacijos gylio vertinimus. Kai kurie refrakcinės chirurgijos lazerinių sistemų gamintojai PMMA bandinius naudoja lazerio parametrų kalibravimui. Tačiau dėl savitų mechaninių savybių PMMA paviršiaus struktūra po abliacijos gerokai skiriasi nuo ragenos paviršiaus. Abliuotas PMMA paviršius turi išreikštą smulkią struktūrą (charakteringi nelygumai yra mikrometrų eilės, t. y. žymiai mažesni už abliuojančio pluošto skersmenį, $\sim 100 \mu\text{m}$), todėl po abliacijos paviršius neišlaiko optinės kokybės, tampa matinis. Taip yra dėl to, jog PMMA, skirtingai nei želatina arba ragena, yra neelastinga, kietą medžiaga, ir, jeigu spinduliuotės šiluminis poveikis yra mažas (medžiaga neišlydoma), po abliacijos paviršius lieka grublėtas. Ši PMMA savybė turi ir teigiamą pusę – matinis paviršius yra geras indikatorius, kuris patvirtina, jog abliacijos femtosekundiniais impulsais metu šiluminis poveikis neviršija medžiagos lydymosi temperatūros. Kita išskirtinė PMMA savybė – inkubacinis UV spinduliuotės poveikis [139]. Paveikus PMMA paviršių



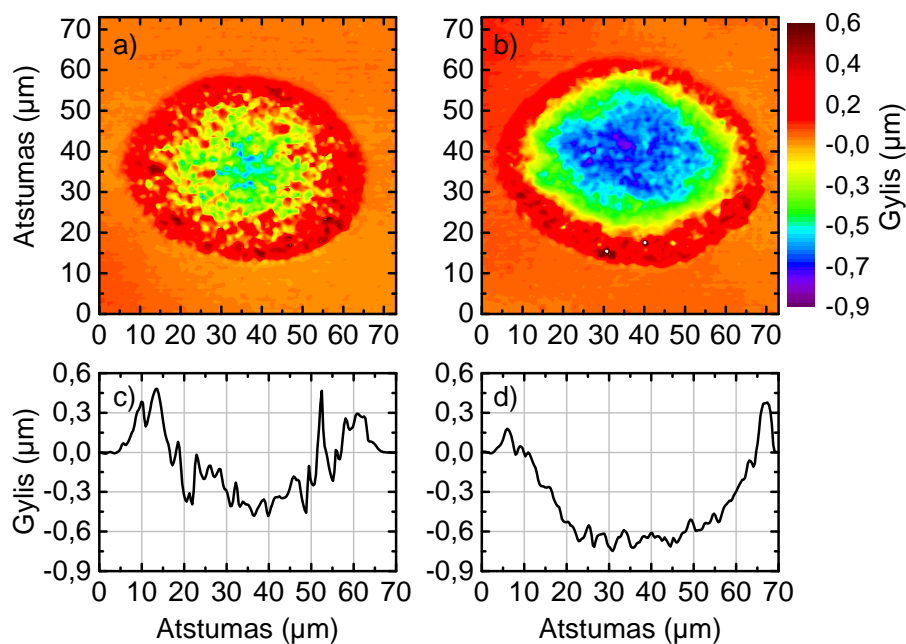
3.4 pav. Femtosekundiniais UV impulsais abliuoto PMMA paviršiaus tamsaus lauko mikroskopijos vaizdas. Prieš abliaciją dalis paviršiaus buvo apšviesta mažo intensyvumo spinduliuote (vaizdas apačioje), kai tuo tarpu kita dalis buvo uždengta (viršuje).

UV spinduliuote, kurios intensyvumas mažesnis nei slenkstinis abliacijos intensyvumas, paviršius vizualiai nepakinta, tačiau vėlesniems impulsams apšviesto paviršiaus abliacijos slenkstinio intensyvumo vertė žymiai sumažėja. Inkubacinis UV spinduliuotės poveikis tampa akivaizdus analizuojant pavienių lazerinių impulsų abliacijos efektyvumą.

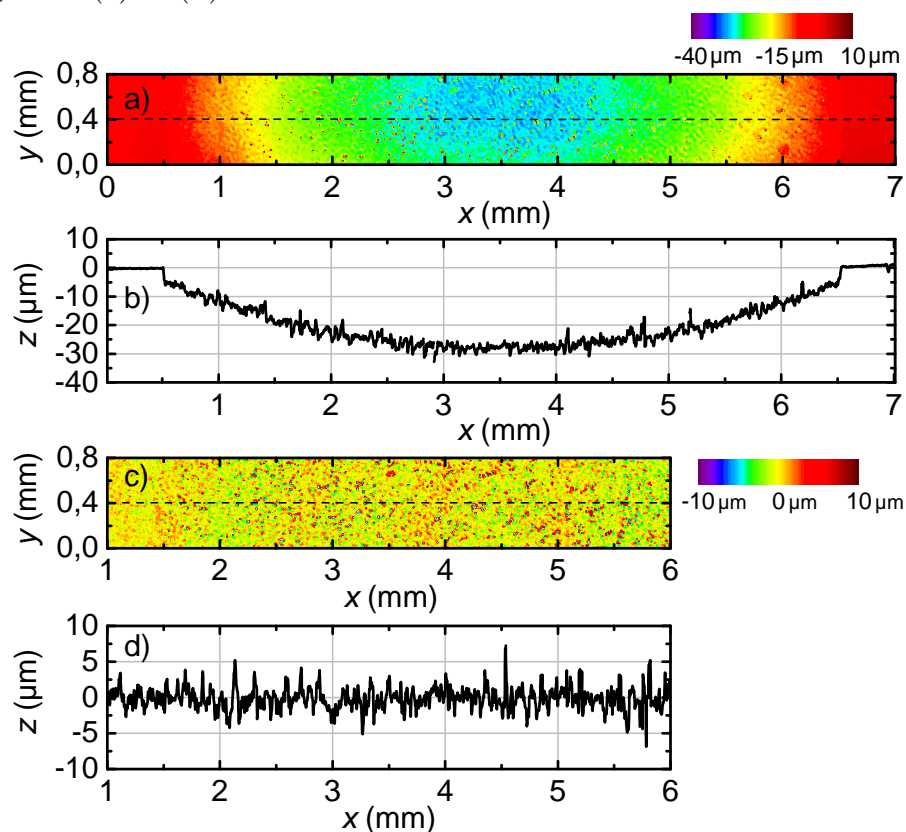
Inkubacinių reiškinų įtaka PMMA abliacijos efektyvumui akivaizdžiai parodyta 3.4 pav. Čia pateikiamas PMMA paviršiaus vaizdas (tamsaus lauko mikroskopija), kai prieš abliaciją nepersiklojančiais 205 nm impulsais (viršūninis energijos tankis $\sim 130 \text{ mJ/cm}^2$) dalis bandinio buvo apšviesta to paties bangos ilgio, bet kelis kartus mažesnio nei slenkstinė abliacijos vertė intensyvumo spinduliuote. Kaip matyti iš 3.4 pav., neapšviestojoje dalyje (vaizdas viršuje) vienu impulsu suformuojamo kraterio skersmuo yra kelis kartus mažesnis, nei apšviestoje (vaizdas apačioje). Taip pat matyti, kad neapšviestoje zonoje kraterius suformavo ne kiekvienas lazerinis impulsas.

3.5 pav. pavaizduota PMMA paviršiuje vienu (a) ir dviem (b) femtosekundiniais UV impulsais suformuotų kraterių topografiniai vaizdai bei jų skerspjūviai (atitinkamai c ir d). Kaip matyti iš topografinių vaizdų, pirmuoju impulsu suformuojamas mažesnio skersmens ($d_x = (60,7 \pm 1,5) \mu\text{m}$, $d_y = (44,9 \pm 2,7) \mu\text{m}$, gylis $\Delta z = (0,4 \pm 0,1) \mu\text{m}$) krateris, kurio kraštuose medžiaga nėra pilnai pašalinama, aplinkui formuojasi kauburiai. Tai gali būti aiškinama taip – Gauso pluošto kraštuose, kur spinduliuotės intensyvumas yra artimas slenkstinei abliacijos intensyvumo vertei, dalis PMMA molekulinę ryšių yra nutraukiama ir medžiaga pradeda plėstis. Tačiau spinduliuotės intensyvumas, o kartu ir nutrauktų molekulinę ryšių skaičius, yra

3. Ragenos abliacija



3.5 pav. PMMA abliacija femtosekundiniais UV impulsais: a) vienu impulsu ir b) dviem impulsais suformuoto kraterio topografinis vaizdas bei jų skerspjūviai (c) ir (d).



3.6 pav. Femtosekundiniais impulsais PMMA paviršiuje suformuoto lęšio a) topografinis vaizdas, b) jo skerspjūvis abscisių ašies kryptimi ties $y = 0,4$ mm, c) centrinės lęšio dalies nuokrypių nuo sferinės aproksimacijos topografinis vaizdas ir d) jo skerspjūvis ties $y = 0,4$ mm.

per mažas, kad medžiagos fragmentai būtų pilnai pašalinami. Dėl to susiformuoja kauburiai.

Antruoju impulsu (3.5 pav., b) suformuojamas didesnio skersmens ($d_x = (68,8 \pm 1,1) \mu\text{m}$, $d_y = (52,7 \pm 0,7) \mu\text{m}$) ir gilesnis krateris ($\Delta z = (0,7 \pm 0,2) \mu\text{m}$), bei pašalinama kelis kartus didesnis PMMA tūris nei pirmuoju impulsu. Dėl inkubacinio pirmojo impulso poveikio antrajam impulsui reikia suardyti žymiai mažiau molekulinę ryšių, kad pluošto periferijoje medžiaga būtų pašalinta. Todėl didėja kraterio skersmuo ir gylis. Toliau didinant impulsų skaičių, inkubaciniai reiškiniai nebedaro didelės reikšmės abliacijos efektyvumui, nes dėl stiprios sugerties didžioji impulso energijos dalis sugerama kelių šimtų nanometrų storio paviršiaus sluoksnyje ir kiekvienas impulsas „jaučia“ tik prieš jį buvusio impulso poveikį.

UV femtosekundiniais impulsais PMMA paviršiuje suformuoto lęšio topografinis vaizdas ir jo skerspjūvis išilgai abscisių ašies pateikti 3.6 pav., a ir b dalyse. Lazerio impulsų pasikartojimo dažnis formuojant lęšį buvo 50 kHz, maksimalus impulso energijos tankis 135 mJ/cm^2 , atstumas tarp gretimų sufokusuoto pluošto dėmių $55 \mu\text{m}$. Norint įvertinti abliuoto paviršiaus nelygumus, lęšis buvo aproksimuotas sferiniu paviršiumi. Gautas skirtuminis lęšio ir jo sferinės aproksimacijos topografinis vaizdas bei jo skerspjūvis išilgai abscisių ašies pateikiami 3.6 pav., c ir d dalyse. Įvertinome nuokrypių dz nuo sferos kvadratinį vidurkį:

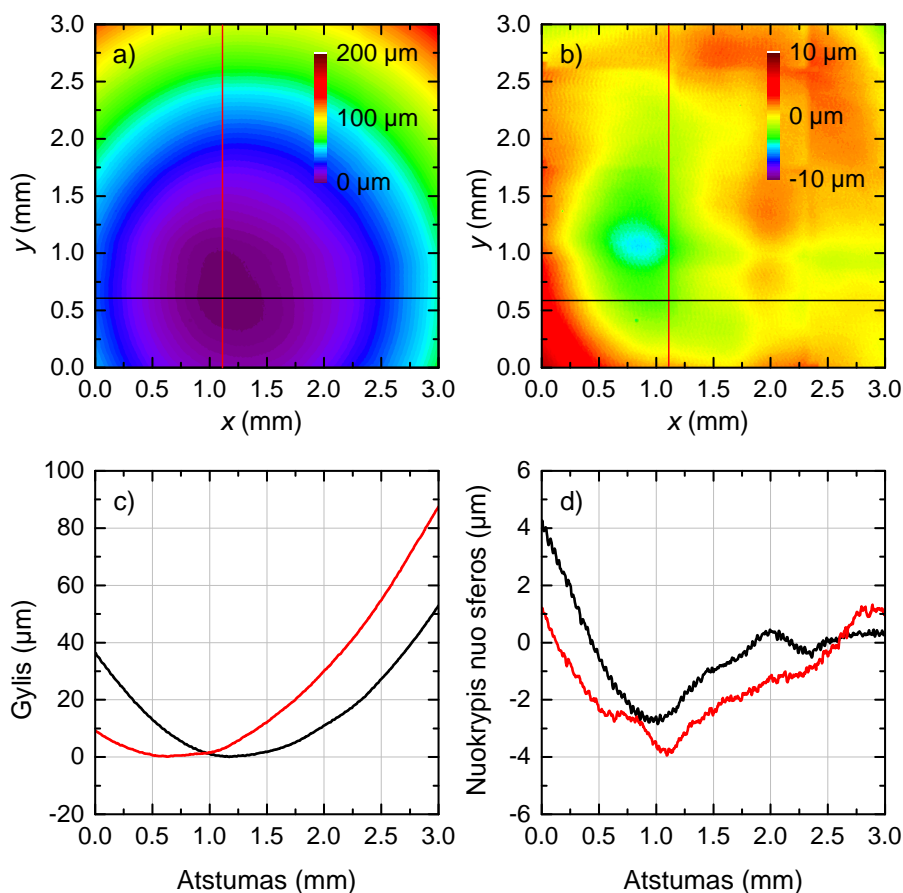
$$dz_{\text{RMS}} = \sqrt{\frac{1}{N} (dz_1^2 + dz_2^2 + \dots + dz_N^2)}, \quad (3.3)$$

čia N – taškų skaičius. Apskaičiuota PMMA paviršiaus nelygumą po abliacijos charakterizuojanti kvadratinio nuokrypių vidurkio dz_{RMS} vertė $1,48 \mu\text{m}$.

3.2.2 Želatinos bandinių abliacija

Elastingų medžiagų paviršius po abliacijos atrodo kiek kitaip nei PMMA. Pavyzdžiui, želatinos bandinių paviršiai po abliacijos femtosekundiniais UV impulsais išlieka glotnūs net ir tada, kai pašalinama net kelių šimtų mikrometrų storio medžiagos sluoksnis. Želatinos, kaip ir ragenos, pagrindinė sudedamoji dalis yra kolagenas. Būtent todėl želatina gerai sugeria UV šviesą. Be to, elastingomis savybėmis želatina taip pat artimesnė ragenai, todėl ir šių medžiagų paviršiai po abliacijos atrodo panašiai. Dar viena savybė, dėl kurios patogiu naudoti želatiną – iš karšto želatinos koloidinio tirpalo lengva išlieti norimos formos bandinius, kurie turi lygius, optinės kokybės paviršius. Tai yra labai patogiu vertinant paviršiaus kokybę po abliacijos,

3. Ragenos abliacija



3.7 pav. Želatinos paviršiuje suformuoto lęšio a) topografija, b) nuokrypis nuo sferinės aproksimacijos, c) lęšio skerspjūviai ir d) skerspjūvių nuokrypiai nuo sferos ties $x = 1,1$ mm (raudona linija) ir $y = 0,6$ mm (juoda linija).

nes vien vizualiai apžiūrėjus bandinį galima greitai ir gana tiksliai įvertinti rezultatus. Taip pat želatinos bandiniai yra labai jautrūs temperatūros pokyčiui, todėl lengva pastebėti, ar abliacijos proceso nelydi šalutinė šiluminė sąveika.

Kaip ir PMMA bandiniuose, želatinoje buvo formuojamos lęšio pavidalo struktūros. Želatinoje suformuoto lęšio paviršiaus topografinis vaizdas (a), jo nuokrypis nuo sferinės aproksimacijos (b) bei atitinkami skerspjūviai ties lęšio centru (c ir d) pateikiami 3.7 pav. Kaip matyti iš šio paveikslėlio, želatinos paviršius po abliacijos yra žymiai lygesnis nei PMMA (žr. 3.6 pav.).

Reikia paminėti, kad 3.7 pav. (o ypač b dalyje) matomos horizontalios ir vertikalios linijos ($y \approx 0,9$ mm, $y \approx 1,75$ mm, $y \approx 2,6$ mm ir $x \approx 1,2$ mm, $x \approx 2,3$ mm) tėra ilgos topografijos matavimo procedūros rezultatas. Kadangi konfokalinis profilometras skenuoja gana nedidelį bandinio plotą ($1,275$ mm \times $0,956$ mm), todėl norint gauti kelių milimetrų skersmens lęšio paviršiaus topografinį vaizdą, matavimai atliekami keletą kartų, paslenkant

bandinį vis į naują poziciją. Nuskenavus visą bandinio plotą, atskirų matavimų rezultatai sujungiami į vieną topografinį vaizdą. Vieno segmento matavimas užtrunka apie 1–2 min (priklausomai nuo skenuojamo gylio), todėl bendra matavimo trukmė matuojant 9 cm² ploto zoną trunka 10–20 min. Tai yra pakankamai ilgas laikas, per kurį želatinos bandinio paviršius gali padžiūti, todėl jungiant skirtingais laikais išmatuotus topografijos segmentus jų riboje matomas šuoliškas aukščio pokytis. Tam, kad būtų išvengta papildomos paklaidos, atsirandančios dėl didelio ploto profiliavimo netikslumų, abliuoto želatinos paviršiaus lygumas buvo vertinamas skaičiuojant kvadratinį nuokrypių vidurkį dz_{RMS} atskiruose topografijos segmentuose, prieš tai iš kiekvieno segmento topografijos atėmus sferinę paviršiaus aproksimaciją. Gauta vidutinė kvadratinio vidurkio vertė $dz_{\text{RMS}} = 0,27 \mu\text{m}$. Želatinai šis paviršiaus kokybę nusakantis parametras yra daugiau kaip penkis kartus mažesnis nei PMMA bandiniui. Tai taip pat paaiškina, kodėl želatinos paviršius po abliacijos išlieka skaidrus, o PMMA smarkiai sklaido šviesą.

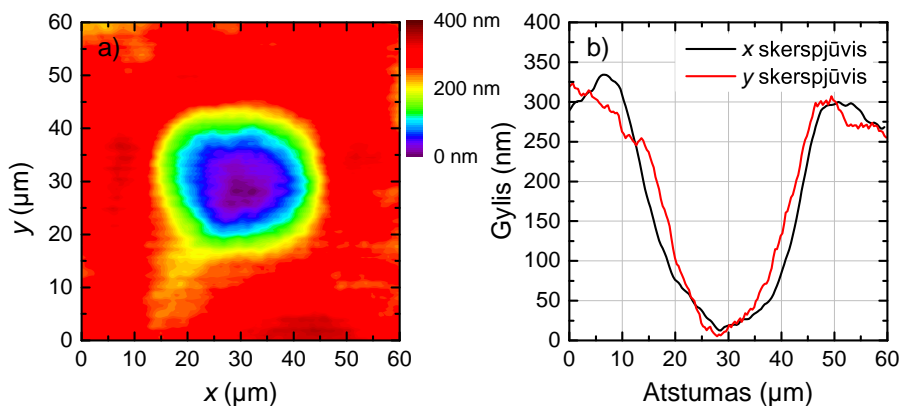
3.2.3 *Ex vivo* kiaulės ragenos abliacija

Pirmieji *ex vivo* kiaulės ragenos stromos abliacijos tyrimai buvo atlikti lazeriui veikiant 12,5 kHz dažniu, kai vidutinė impulsų galia buvo $P = 27 \text{ mW}$, o pluošto skersmuo sąsmaukoje $\sim 44 \mu\text{m}$ (išmatuota $1/e^2$ maksimalaus intensyvumo lygyje „peilio ašmenų“ (angl. *knife-edge*) metodu [140], tariant kad pluošto intensyvumo skirstinys yra artimas Gauso skirstiniui). Abliuojančios dėmės dydis buvo įvertintas konfokaliniu profilometru (3.8 pav.), išmatuotos duobutės skersmuo buvo $\sim 35 \mu\text{m}$. Iš 3.8 pav. matyti, jog vienu impulsu kiaulės ragenoje suformuojamas gana taisyklingos formos krateris lygiu dugnu (skirtingai nei PMMA paviršiuje).

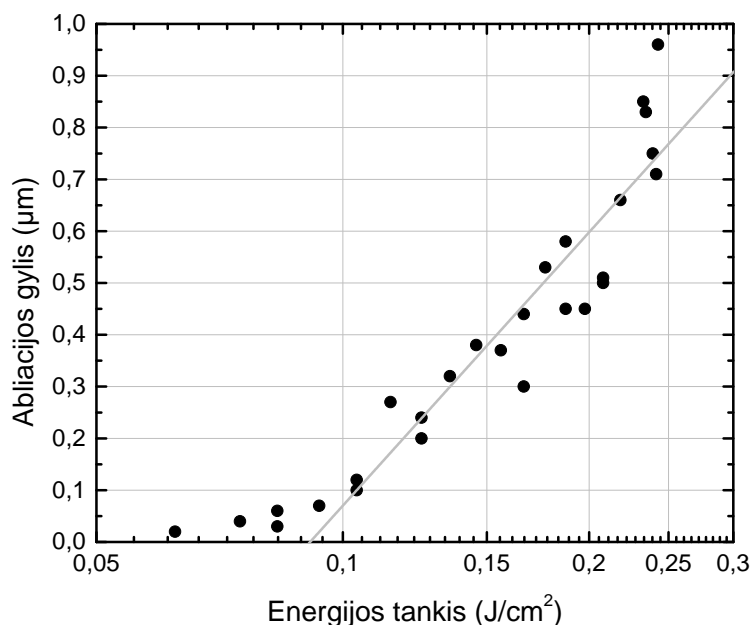
Lazerio pluošto skenavimo parametrai (skenavimo greitis ir atstumas tarp skenuojamų eilučių) buvo parinkti atsižvelgiant į abliacijos dėmės profilį. Atstumas tarp gretimų dėmių buvo parinktas šiek tiek mažesnis nei vienu impulsu suformuojamo kraterio skersmuo. Skenuojant Gauso pluoštą rastru, gretimi lazerio impulsai iš dalies persikloja, todėl šalinamas gana tolygaus storio medžiagos sluoksnis.

Tam, kad lazerio impulsais būtų galima pašalinti norimą kiekį ragenos audinio, iš pradžių reikia įvertinti ragenos slenkstinę abliacijos intensyvumą bei abliacijos gylio priklausomybę nuo energijos tankio. Tam tikslui, skenuodami lazerio pluoštą rastru ir keisdami UV impulsų vidutinę galią nuo 6,5 mW iki 31 mW, abliavome *ex vivo* kiaulės rageną bei matavome abliacijos gylį. Kad galėtume tiksliau išmatuoti abliacijos gylį, lazerio pluoštą

3. Ragenos abliacija



3.8 pav. *Ex vivo* kiaulės ragenoje vienu impulsu suformuotos duobės a) topografinis vaizdas ir b) skerspjūviai x ir y kryptimis.



3.9 pav. *Ex vivo* kiaulės ragenos stromos abliacijos gylio priklausomybė nuo energijos tankio. Matavimų duomenys (juodi taškai) impulso energijos tankių intervale nuo $0,1 \text{ J/cm}^2$ iki $0,25 \text{ J/cm}^2$ aproksimuoti pagal (3.4) formulę (pilka tiesė).

$1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ zonoje pakartotinai skenavome 50 kartų. Abliacijos gylis buvo vertinamas optiniu konfokaliniu profilometru. Išmatuota kiaulės ragenos stromos abliacijos gylio priklausomybė nuo impulso energijos tankio pavaizduota 3.9 pav.

Kaip matyti iš 3.9 pav., *ex vivo* kiaulės ragenos stromos abliacija 205 nm bangos ilgio, $\sim 300 \text{ fs}$ trukmės impulsais vyksta kai energijos tankis viršija $0,06 \text{ J/cm}^2$. Kai energijos tankis didesnis nei $0,1 \text{ J/cm}^2$, abliacijos gylio

3.2. Ex vivo ragenos ir modelinių medžiagų abliacija

priklausomybė gerai aprašoma formule:

$$d = \frac{1}{\alpha} \ln \left(\frac{F}{F_{sl}} \right), \quad (3.4)$$

čia α – kiaulės ragenos stromos sugerties koeficientas 205 nm bangos ilgiui, F – energijos tankis, F_{sl} – slenkstinis kiaulės ragenos stromos abliacijos energijos tankis. Aproximavę eksperimentinius duomenis pagal šią formulę (žr. 3.9 pav., pilka linija) gavome, kad kiaulės ragenos slenkstinio abliacijos energijos tankio vertė yra $(0,091 \pm 0,005) \text{ J/cm}^2$. Tačiau, kaip matyti iš grafiko, abliacijos procesas vyksta net ir tada, kai energijos tankis yra mažesnis už šią vertę. Tai reiškia, kad energijos tankiui artėjant prie slenkstinės abliacijos vertės, abliacijos gylio priklausomybė nebetenkina (3.4) formulės. Tokį abliacijos gylio priklausomybės nuo energijos tankio pobūdį galima paaiškinti tuo, kad šalinamų ragenos audinio fragmentų dydžiai nėra vienodi [38]. Įsivaizduokime, kad kiekvienas medžiagos fragmentas prieš abliaciją yra laikomas molekulinėmis jungtimis, kurių skaičius yra proporcingas fragmento paviršiaus plotui. Fragmentas išlaisvinamas kai šie laikantys molekuliniai ryšiai nutraukiami. Didesniems medžiagos fragmentams tūrio ir paviršiaus ploto santykis yra didesnis nei tas pats santykis mažiems fragmentams, todėl slenkstinė abliacijos intensyvumo vertė skirtingo dydžio medžiagos fragmentams nėra vienoda, o mažėja didėjant fragmento dydžiui. Kadangi ragenos stroma nėra homogeniška, eksperimentiškai išmatuota vidutinio abliacijos gylio priklausomybė nuo energijos tankio artėjant link abscisių ašies tampa nuožulnesnė nei kad seka iš (3.4) formulės.

Mūsų išmatuotos abliacijos gylio priklausomybės nuo energijos tankio pobūdis atitinka teorinės kreivės pobūdį [38], kuris būdingas ragenos abliacijai 193 nm [93, 108, 141] ir 213 nm [142, 143] bangos ilgio impulsais. Iš 3.9 pav. pavaizduoto grafiko matyti, kad femtosekundiniams 205 nm impulsams *ex vivo* kiaulės ragenos stromos abliacijos slenkstinė energijos tankio vertė $\sim 0,06 \text{ J/cm}^2$. Ši vertė yra artima literatūroje pateikiamoms nanosekundinių UV impulsų slenkstinio abliacijos energijos tankio vertėms, kurios 193 nm bangos ilgio spinduliuotei yra tarp $0,03 \text{ J/cm}^2$ ir $0,05 \text{ J/cm}^2$ [93, 141, 144, 145], o 213 nm impulsams – tarp $0,05 \text{ J/cm}^2$ ir $0,07 \text{ J/cm}^2$ [137, 143].

Atlikę *ex vivo* kiaulės ragenos abliacijos eksperimentus, nustatėme, kaip ragenos abliacijos gylis priklauso nuo energijos tankio. Ši priklausomybė yra labai svarbi, nes, atsižvelgiant į ją bei lazerinės sistemos spinduliuotės charakteristikas (impulsų pasikartojimo dažnį, pluošto diametrą ir intensyvumo skirstinį), galima parinkti optimalius darbinius parametrus refrak-

3. Ragenos abliacija

cinių ydų korekcijos procedūroms. Pavyzdžiui, mažo energijos tankio impulsai naudotini norint pasiekti didelę abliacijos gylio skiriamąją gebą ir tiksliai formuoti ragenos paviršių. Tačiau dėl to gali išaugti regos korekcijos procedūros trukmė. Tuo tarpu, kai ragenos abliacijai naudojamas ne stačiakampio pavidalo intensyvumo skirstinį turintis pluoštas (pvz. Gauso arba supergausinis), dalyje pluošto intensyvumas yra mažesnis už slenksinę abliacijos vertę, todėl dalis impulso energijos virsta šiluma. Šiluminiai nuostoliai gali būti sumažinti didinant impulso energijos tankį [146]. Tada didesnė energijos dalis panaudojama abliacijai, bet prastėja abliacijos gylio skyra. Taigi, atsižvelgiant į abliacijai naudojamos lazerinės sistemos parametrus, visada ieškoma kompromiso tarp procedūros trukmės ir abliacijos tikslumo bei stengiamasi išlaikyti minimalų šiluminį spinduliuotės poveikį.

Apibendrinant, modelinės medžiagos ir *ex vivo* audiniai yra nepamainomi derinant lazerinės sistemos ir galvanometrinių veidrodėlių skenerių parametrus, kuriant ir tarpusavyje lyginant abliacijos algoritmus bei tikrinant rezultatų atsikartojamumą. Pasitelkus modelines medžiagas ir *ex vivo* audinius pademonstruotos femtosekundinių UV impulsų taikymo refrakcinių regos ydų korekcijai galimybės plačiau aptariamoms mūsų publikacijoje [147].

3.3 *In vivo* triušio ragenos abliacija

Ragenos abliacijos tyrimus atlikome su 3–16 mėnesių amžiaus, 1,3–4 kg svorio burgundiškais triušiais (iš viso 81), gautais iš Vilniaus universiteto Imunologijos instituto.²

In vivo ragenos stromos abliacijos eksperimentuose (išskyrus vieną) visada imitavome trumparegystės korekciją. Trumparegystės korekciją pasirinkome dėl kelių priežasčių. Pirma, trumparegių žmonių skaičius visame pasaulyje sparčiai auga [1] ir natūralu, kad būtent lazerinė trumparegystės korekcijos procedūra klinikose atliekama dažniausiai. Antra, pašalinus lęšio pavidalo ragenos sluoksnį, didžiausias abliacijos gylis gaunamas apdorotos zonos centre, todėl pamatavus ragenos storį prieš procedūrą ir po jos nesunku įvertinti didžiausią abliacijos gylį, o kartu ir sukurtą refrakcijos pokytį. Trečia, tokios korekcijos metu ragenos paviršiaus temperatūros pokytis yra maksimalus, nes lazeriniais impulsais ilgiausiai veikiama būtent centrinė abliacijos zonos dalis, tuo tarpu toliaregystės korekcijos atveju didžiausias abliacijos gylis formuojamas periferijoje ir šilumos kiekis paskirstomas di-

²Bandymai su gyvūnais buvo atlikti gavus Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimus Nr. 0180 ir Nr. 0213

desnėje žiedo pavidalo zonoje. Kaip parodysime šiame skyriuje, maksimali ragenos paviršiaus temperatūra yra svarbus parametras, kuris gali daryti didelę įtaką pooperaciniam gijimui.

In vivo tyrimai buvo atliekami trimis etapais:

1. Pirmasis etapas buvo skirtas pradinių lazerinės sistemos parametrų parinkimui, pirminiam triušio ragenos abliacijos femtosekundiniais UV (205 nm) impulsais įvertinimui bei operacijos eigos ir baigčių vertinimo protokolo parengimui (rezultatai aprašomi 3.3.2 skyrelyje).
2. Antrojo tyrimų etapo tikslas buvo palyginti triušio ragenos abliacijos rezultatus bei ragenos gijimo tendencijas po FRK procedūros femtosekundiniais UV (205 nm) impulsais bei analogiškos procedūros nanosekundiniais eksimerinio ArF lazerio UV (193 nm) impulsais (rezultatai aprašomi 3.3.3 skyrelyje).
3. Trečiasis etapas buvo skirtas ragenos abliacijos rezultatų ir gijimo eigos įvertinimui po greitos (didelės abliacijos spartos) ir gilios transepitelinės abliacijos (transepitelinės fotorefrakcinės keratektomijos (TransFRK) procedūra) femtosekundiniais UV (205 nm) impulsais bei analogiškos transepitelinės abliacijos nanosekundiniais UV (193 nm) impulsais (rezultatai aprašomi 3.3.4 skyrelyje).

3.3.1 Tyrimų metodika

Femtosekundinės lazerinės sistemos parametrai. Femtosekundinės lazerinės Yb:KGW sistemos su penktosios harmonikos generatoriumi spinduliuotės parametrai trijų *in vivo* tyrimų etapų metu pateikti 3.1 lentelėje. FRK eksperimentuose buvo naudojami du parametrų rinkiniai.

Kaip matyti iš 3.1 lentelės, ragenos laužiamosios gebos modifikavimo tyrimų metu femtosekundinės lazerinės sistemos spinduliuotės parametrai buvo keičiami gana plačiose ribose: impulsų pasikartojimo dažnis buvo keičiamas nuo 5 kHz iki 50 kHz, vidutinė spinduliuotės galia – nuo 145 mW iki 400 mW, pluošto skersmuo – nuo 80 μm iki 280 μm . Lyginant mūsų paskutinius TransFRK eksperimentus su pirmaisiais *in vivo* abliacijos bandymais ragenos abliacijos greitis buvo padidintas keletą kartų. Todėl natūralu, kad keičiant lazerinės sistemos parametrus buvo ieškoma geriausio pluošto skenavimo algoritmo, kuris leistų išlaikyti minimalią paviršiaus temperatūrą abliacijos metu kartu išlaikant abliuojamo paviršiaus kokybę. Atlikdami laužiamosios gebos pokyčio formavimo eksperimentus *in vivo* triušio ragenoje naudojome kelis skirtingus lazerio pluošto skenavimo algoritmus.

3. Ragenos abliacija

3.1 lentelė Lazerio spinduliuotės parametrai *in vivo* ragenos abliacijos eksperimentų metu.

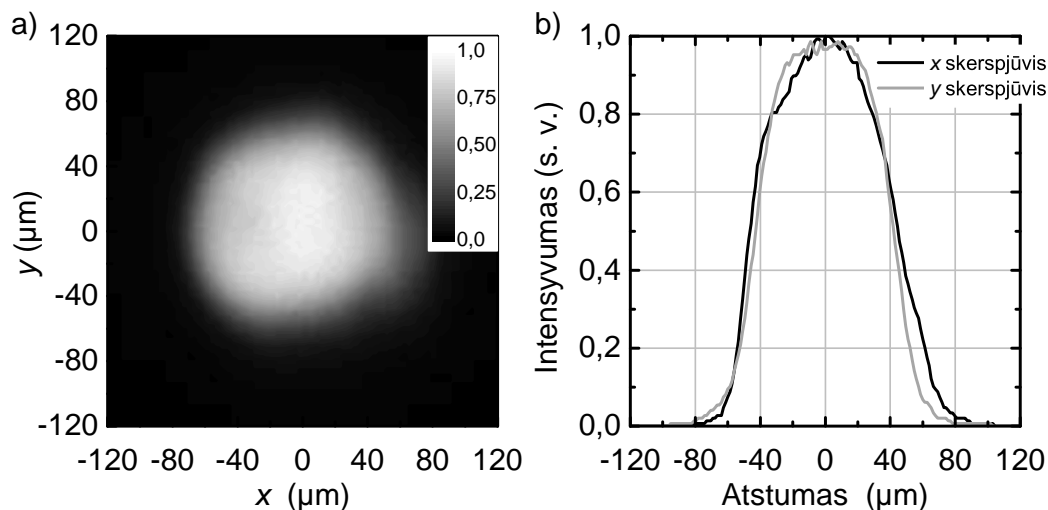
	Pirmasis etapas	FRK	FRK	TransFRK
Impulsų pasikartojimo dažnis (kHz)	5–20	5	20	50
Vidutinė 205 nm spinduliuotės galia (mW)	145–200	200	180	400
Fundamentinės spinduliuotės impulso trukmė (fs)	200	200	200	280
Pluošto skersmuo ties abliuojamu paviršiumi $1/e^2$ maksimalaus intensyvumo lygyje (μm)	80–280	280	130	115
Maksimalus 205 nm impulsų energijos tankis (mJ/cm^2)	130–290	130	130	135

Pirmuosiuose bandymuose suformuoti refrakcijos pokytį imituojant trumparegystės korekcijos procedūrą Gauso pluoštą skenavome rastru, skritulio pavidalo sluoksniais (žr. 3.3 pav., a ir c dalis). Atsižvelgiant į lazerio impulsų pasikartojimo dažnį bei pluošto skersmenį sąsmaukoje, skenavimo greitis bei atstumas tarp rastro linijų buvo parenkamas taip, kad pavieniais impulsais suformuotos duobutės iš dalies persiklotų ir būtų pašalinamas tolygus medžiagos sluoksnis. Rageną buvo šalinama pradedant nuo mažiausio skersmens sluoksnio ir baigiant didžiausiu.

Šis būdas turi porą trūkumų. Pirma, vienas po kito dėliojami tarpusavyje persiklojantys impulsai lokaliai šildo abliuojamą paviršių, todėl didėja rizika netiesiogiai pažeisti gilesnius ragenos stromos audinio sluoksnius. Antra, lazerio pluoštą skenuojant rastriniu būdu ir nekeičiant rastro linijų posūkio kampo, ragenos paviršiuje po abliacijos suformuojami nepageidaujami lygiagretūs grioveliai.

Norėdami išvengti šių šalutinių rezultatų, FRK procedūros tyrimams modifikavome skenavimo algoritmą. Tam, kad sumažintume lokalų impulsų persiklojimo dažnį (t. y. padidintume vidutinį laiko tarpą tarp dviejų persiklojančių impulsų), padalinome vieną skenavimo sluoksnį į keturis pasluoksnius – dvigubai praretinome rastro eilutes ir padidinome atstumus tarp gretimų impulsų vienoje rastro linijoje. Tam, kad sumažintume rastrinio skenavimo įtaką abliuoto paviršiaus kokybei, įvedėme skenavimo sluoksnių sukimą abliuojamos zonos centro atžvilgiu.

Kaip ir tikėjomės, modifikuotas skenavimo algoritmas leido sumažinti



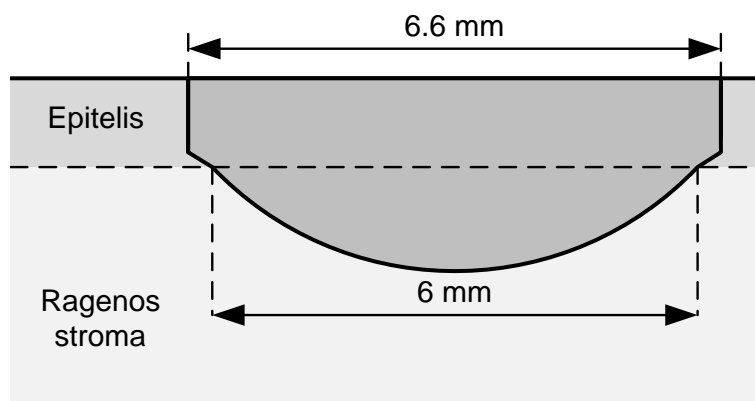
3.10 pav. Femtosekundinio UV pluošto intensyvumo skirstinys ties ragenos paviršiumi. a) safyro plokštelės liuminescencijos intensyvumo skirstinys ir b) jo skerspjūviai x (juoda linija) ir y (pilka linija) ašių kryptimis.

lokalų ragenos kaitinimą bei pagerinti ragenos stromos paviršiaus kokybę po abliacijos. Šį skenavimo algoritmą naudojome atlikdami FRK procedūrą femtosekundiniais impulsais.

Norėdami padidinti abliacijos našumą TransFRK procedūrai modifikavome abliuojančio pluošto intensyvumo skirstinį. Gauso pavidalo pluoštą konvertavome į supergausinį. Penktosios harmonikos pluošto intensyvumo skirstinys buvo įvertintas naudojant CCD kamerą ir registruojant ties abliuojamu paviršiumi patalpintos 0,2 mm storio safyro plokštelės liuminescenciją (3.10 pav.). Iš liuminescencijos intensyvumo skirstinio įvertintas pluošto skersmuo $1/e^2$ maksimalaus intensyvumo lygyje buvo $115 \pm 5 \mu\text{m}$ ir gerai sutapo su „peilio ašmenų“ matavimo metodu išmatuota pluošto skersmens vertė $113 \pm 10 \mu\text{m}$. Išmatuotą pluošto intensyvumo skirstinį aproksimavus antros eilės supergausine funkcija buvo įvertinta maksimali energijos tankio vertė $F = 135 \pm 5 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ pluošto centre. Lyginant su Gauso pluoštu, supergausinis erdvinis intensyvumo skirstinys turi vieną privalumą – abliuojant mažesnė impulso energijos dalis prarandama pluošto „sparnuose“, kur intensyvumas yra mažesnis už slenkstinę abliacijos intensyvumo vertę. Dėl to mažesnė energijos dalis tenka medžiagos šildymui ir didesnė sunaudojama fotoabliacijai.

TransFRK procedūros metu pirmiausia buvo pašalinamas ragenos epitelio sluoksnis, o tada ragenos stromoje formuojamas refrakcijos pokytis. Epitelis buvo šalinamas skenuojant lazerio pluoštą praretintomis rastro eilutėmis, kiekvieną sluoksnį pasukant prieš tai buvusio sluoksnio atžvilgiu. Tam, kad pereinant epitelio ir stromos ribą stromoje nebūtų suformuotas

3. Ragenos abliacija



3.11 pav. Ragenos skersinis pjūvis ir TransFRK procedūros metu suformuojamo darinio profilis.

status laiptelis ties abliacijos zonos kraštu, 80 % epitelio abliacijos buvo atliekama skenuojant lazerio pluoštą pastovaus 6,6 mm skersmens zonoje, o 20 % – tiesiškai mažinant abliacijos zonos skersmenį iki 6 mm (žr. 3.11 pav.).

TransFRK procedūrai lazerio impulsų pasikartojimo dažnis buvo 2,5 karto didesnis nei ankstesniuose FRK eksperimentuose, todėl, norint išlaikyti pastovų atstumą tarp impulsų skenavimo eilutėje, reikėjo dar labiau didinti (jau ir taip didelį) pluošto skenavimo greitį. Eilutės gale lazerio spinduliuotė išjungiamą, nes keičiant skenavimo kryptį veidrodėliai juda su pagreičiu. Naujoje eilutėje lazerio spinduliuotė įjungiamą tik pasiekus pastovų skenavimo greitį. Todėl kai didinamas skenavimo greitis, kartu didėja galvanometrų įgreitėjimo ir stabdymo laikas. Mūsų atveju, padidinus skenavimo greitį 2,5 karto, šis nenaudingas laikas sudarytų maždaug 20–30 % visos procedūros trukmės. Dėl šios priežasties nusprendėme nebedidinti skenavimo greičio ir atsisakėme impulsų retinimo vienoje skenavimo eilutėje. Vietoje to, imdami kas penktą sluoksnio eilutę, kiekvieną skenavimo sluoksnį padalinome į penkis pasluoksnius: pirmąjį pasluoksnį sudaro 1, 6, 11, 16 t. t., antrąjį – 2, 7, 12, 17 t. t., trečiąjį – 3, 8, 13, 18 t. t., ketvirtąjį – 4, 9, 14, 19 ir t. t., o penktąjį – 5, 10, 15, 20 ir t. t. sluoksnio eilutės. Iš kiekvieno sluoksnio imant po pirmąjį pasluoksnį bei mainant didelio ir mažo skersmens pasluoksnius paeiliui, buvo suformuojamas penktadalis viso numatyto refrakcijos pokyčio. Visas refrakcijos pokytis suformuojamas dar keturis kartus pakartojus tą pačią procedūrą su antraisiais, trečiaisiais, ketvirtaisiais ir penktaisiais visų sluoksnių pasluoksniais. Siekiant išvengti dėl rastrinio skenavimo būdo suformuojamų lygiagrečių griovelių, kaip ir FRK eksperimentų metu, kiekvienas skenavimo sluoksnis buvo sukamas abliacijos zonos centro atžvilgiu.

Eksimerinės ArF lazerinės sistemos parametrai. Tam, kad galėtume palyginti ragenos abliacijos femtosekundiniais impulsais eksperimentų rezultatus su atitinkamais rezultatais po abliacijos klinikiniam taikymams apčiuota eksimerine ArF lazerine sistema, dalį triušių operavome komercinėje nanosekundine sistema „Technolas 217z100“ („Technolas Perfect Vision“, JAV). Kadangi ši sistema turi akies judesių sekimo pagal rainelę funkciją, triušio akis procedūros metu nebuvo papildomai imobilizuota. Eksimerinio lazerio impulsų pasikartojimo dažnis buvo 50 Hz, impulso energijos tankis $120 \pm 5 \text{ mJ/cm}^2$, pluošto skersmuo 2 mm (plokščios viršūnės intensyvumo skirstinys), impulso trukmė 18 ns.

Antrajame tyrimų etape (rezultatai aprašomi 3.3.3 skyrelyje) eksimerinė ArF lazerinė sistema buvo naudojama FRK procedūroms atlikti. Prieš FRK procedūrą ragenos plotas, nuo kurio nuvalomas epitelis, buvo žymimas mechaniniu žymekliu. Atliekant FRK procedūras buvo nustatyta 5 mm skersmens optinė abliacijos zona, perėjimo zonos dydis apskaičiuotas automatiškai ir nebuvo keičiamas.

Trečiajame tyrimų etape (rezultatai aprašomi 3.3.4 skyrelyje) eksimeriniu lazeriu buvo imituojama TransFRK procedūra. Ji buvo atliekama dviem etapais: 1) iš pradžių atliekama fototerapinės keratektomijos (FTK) procedūra, kurios metu tolygiais sluoksniais šalinamas epitelis; pilnai pašalinus epitelį, atliekama 2) standartinė FRK procedūra – stromoje suformuojamas refrakcijos pokytis.

Operacijos protokolas. Prieš atliekant narkozę, triušiui į akį įlašinama vienas lašas chloramfenikolio ir deksametazono (Oftan dexa-chloro) tirpalo. Eksperimentų metu visi triušiai buvo užmigdomi suleidus 35 mg/kg ketamino hidroklorido (Byoketan) ir 10 mg/kg ksilazino hidroklorido (Xylazine 2 %). Prieš operaciją ir operacijos metu akies praplovimui buvo naudojamas subalansuotų druskų tirpalas (angl. *Balanced Salt Solution*, BSS). Refrakcijos korekcijos procedūrą atliekant femtosekundiniu lazeriu, užmigdytas triušis buvo paguldomas į specialiai operacijai pagamintą lovą, nukerpanos į operacijos zoną patenkančios blakstienos ir užklijuojama sterili, kailį prilaikanti operacinė plėvelė. Reguluojant operacinę lovą trimis kryptimis bei keičiant triušio galvos pokrypio kampą, akis pozicionuojama ties žiedo formos vakuuminio siurbtuko. *In vivo* triušių operacijoms buvo pagaminti trijų rūšių vakuuminiai siurbtuvai: 15 mm ir 13 mm diametro siurbtuvai aukštais kraštais ir 13 mm diametro siurbtuvai žemais kraštais. Siurbtuvas buvo parenkamas atsižvelgiant į individualaus triušio akies ir trečiojo

3. Ragenos abliacija

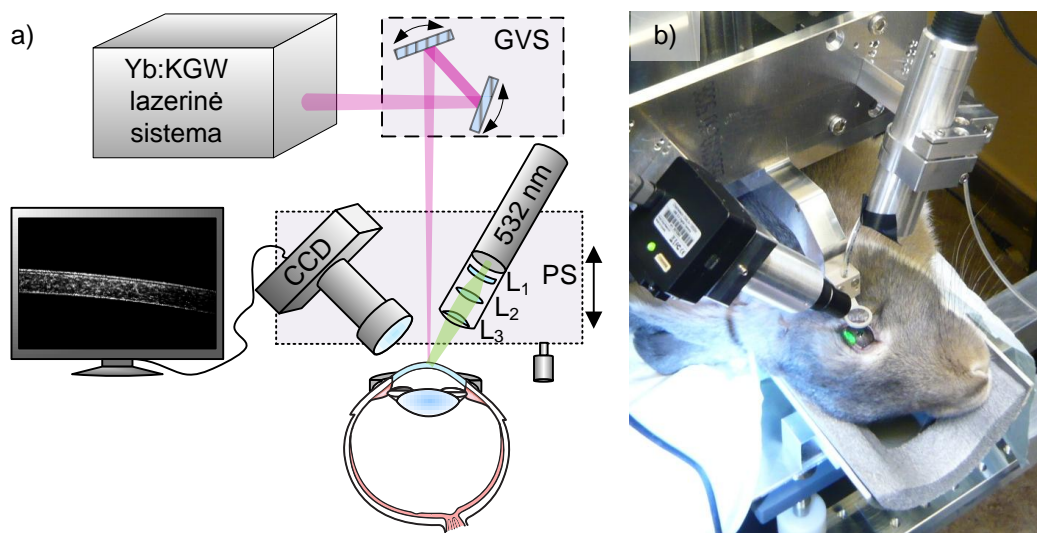
voko dydį. Akis pagal vyzdį centruojama siurbtuko atžvilgiu ir, pasiekus reikiamą poziciją, įjungiamas siurbimas – akis imobilizuojama. Sulašinus pirmą vietinio anestetiko proksimetakaino hidrochlorido 5 mg/ml (Alcaine) tirpalo dozę, siurbtuko žiedo centre pachimetru „Pocket II“ („Quantel Medical“, Prancūzija) matuojamas ragenos storis. Atlikus matavimą, antrą kartą lašinamas anestetikas. Tada femtosekundiniu lazeriu atliekama lazerinė refrakcinė trumparegystės korekcijos procedūra. Kaip jau buvo minėta, šiame darbe aprašomos dvi skirtingo pobūdžio refrakcijos korekcijos procedūros, kurios buvo atliekamos femtosekundiniais impulsais, *in vivo* triušio ragenoje.

Pirmoji, tai FRK procedūra. Jos metu mechaniškai nuvalomos epitelio ląstelės, o po to atliekama ragenos stromos abliacija femtosekundiniais UV impulsais. Šios procedūros metu femtosekundinio lazerio UV spinduliuote epitelyje apibrėžiamas 6,5 mm skersmens apskritimas, taip pažymimas de-epitelizacijos plotas, kurio centre vėliau bus atliekama abliacija. Nuo šios lazeriu pažymėtos zonos, naudojant chirurginę mentelę, mechaniškai pašalinamas epitelis ir antrą kartą pachimetru pamatuojamas ragenos storis. Tada femtosekundiniais UV impulsais atliekama miopinė ragenos stromos abliacija 5 mm skersmens optinėje zonoje ir suformuojama papildoma 0,5 mm perėjimo zona (visas abliacijos zonos diametras 6 mm). Ši zona formuojama tam, kad būtų sušvelninta riba tarp abliuoto ir neabliuoto ragenos paviršiaus, t. y. kad abliacijos zonos krašte neliktų šuoliško ragenos kreivumo spindulio pokyčio.

Antroji abliacijos procedūra – TransFRK. Jos metu epitelis šalinamas nekontaktiniu būdu, atliekant „šulinio“ (pilnavidurio cilindro) pavidalo abliaciją. Pašalinus epitelį, ragenos stromoje formuojamas refrakcijos pokytis. Ragenos skersinis pjūvis ir TransFRK procedūros metu suformuoto darinio profilis pavaizduotas 3.11 pav.

Po refrakcinės korekcijos procedūros dar kartą atliekama pachimetrija, išjungiamas prisiurbimas, pašalinama kailį laikanti plėvelė. Operuota rageną patepama chloramfenikolio ir deksametazono (Oftan Dexa-Chlora) tepalu, dedamas sterilus tvarstis ir užklijuojama pleistru. Po operacijos triušis sugražinamas į vivariumą ir nuimamas tvarstis (jeigu triušis dar būna jo nenusidraskęs).

Po operacijos chloramfenikolio ir deksametazono (Oftan Dexa-Chlora) lašai buvo lašinami septynias dienas po keturis kartus, po to dar tris dienas po du kartus per dieną.

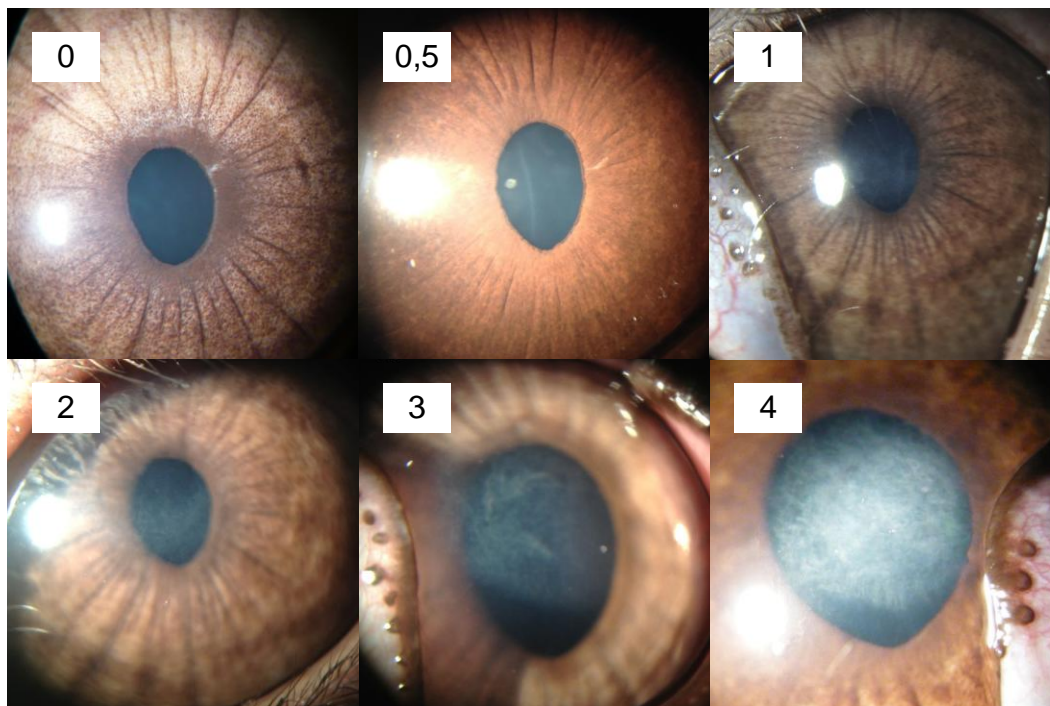


3.12 pav. Ragenos storio matavimo sistemos principinė schema (a) bei šios sistemos taikymo praktikoje pavyzdys (b). L_1 – L_3 – lęšiai, PS – poslinkio staliukas, GVS – galvanometriniai veidrodėlių skeneriai.

Ragenos storio stebėjimas operacijos metu. Ragenos storio įvertinimui ir paviršiaus kokybės charakterizavimui buvo surinkta 3.12 pav. pavaizduota plyšinio apšvietimo sistema. 532 nm bangos ilgio lazerio pluoštas išplečiamas lęšiais L_1 ir L_2 ir fokusuojamas į ploną juostelę cilindrinio lęšiu L_3 ($F = +50$ mm) ties ragenos paviršiumi. Ragenoje išsklaidyta šviesa registruojama naudojant skaitmeninę CCD kamerą CMLN-13S2M-CS („Point Grey“, Kanada). Taip atvaizduojamas ragenos skerspjūvis $\sim 1,25$ mm ilgio zonoje. Šiuo metodu galima stebėti femtosekundine lazerine spinduliuote suformuotą ragenos lopa, įvertinti ragenos lopo storio pokyčius skirtingose lopo vietose, charakterizuoti ragenos paviršiaus nelygumus ir registruoti ragenos storio kitimą abliacijos metu. Akies ragenos storio pokytis įvertinamas paslenkant ant poslinkio staliuko PS pritvirtintą matuojančią sistemą žinomu atstumu ir išmatuojant, kokį bandinio paviršiaus poslinkį tai atitinka ekrane. Žinant šį poslinkių santykį ir užfiksavus ragenos vaizdą prieš abliaciją ir po jos, galima apskaičiuoti absoliutų ragenos storio pokytį. Lazerio pluošto kritimo kampas ($\alpha = 30^\circ$) parinktas taip, kad į CCD kamerą nepatektų nuo ragenos paviršiaus atsispindėjusi spinduliuotė, o būtų stebima tik tūryje skaidoma šviesa (kamera orientuota 45° kampu).

3.12 pav. pavaizduota sistema tinka ne tik ragenos tūryje išsklaidytos šviesos, bet ir ragenos paviršiaus stebėjimui – tam tereikia lazerinį šviesos šaltinį pakeisti paprasta lempa, kuri tolygiai apšviestų tiriamą paviršių.

3. Ragenos abliacija



3.13 pav. Skirtingo intensyvumo triušio ragenos subepitelinės miglos nuotraukos, darytos pooperacinių apžiūrų metu. Nuotraukų kampuose žymimas drumsties laipsnis pagal Fanteso skalę [148]. E. Danielienės nuotraukos.

Pooperacinis stebėjimas. Iki reepitelizacijos pabaigos triušių ragenos buvo apžiūrimos plyšine lempa ir fotografuojamos kas 1–3 dienas, po to pirmą mėnesį kas savaitę ir vėliau kas mėnesį iki 6 mėnesių. Apžiūros metu triušiai nebuvo migdomi. Ragenų subepitelinė migla (drumstis) buvo vertinama naudojant plyšinę lempą. Subepitelinės miglos laipsnis buvo vertinamas pagal Fanteso ir bendraautorių sudarytą skalę [148]. Pagal šią skalę subepitelinė miglos laipsnis lygus:

- 0 – ragena yra visiškai skaidri;
- 0,5 – vos įžiūrima drumstis, atidžiai stebint įstrižu apšvietimu;
- 1 – kiek didesnė drumstis, netrukdanti įžiūrėti smulkių rainelės detalių;
- 2 – švelnus rainelės detalių neryškumas;
- 3 – vidutinis rainelės ir lęšiuko vaizdo neryškumas;
- 4 – intensyvi stromos drumstis abliacijos vietoje.

Nuotraukos, iliustruojančios skirtingus triušio ragenos subepitelinės miglos laipsnius, pateikiamos 3.13 pav.

Praėjus savaitei po operacijos (ataugus epiteliui) pachimetru buvo matuojamas ragenos storis: po apžiūros plyšine lempa sulašinama vietinio anestetiko proksimetakaino hidrochlorido ir, ragenos drumsties centre (jeigu

ji buvo matoma plika akimi) arba ragenos centre (jeigu drumstis nežymi), išmatuojamas ragenos storis.

Histologiniai tyrimai. Po numaravimo triušių akių obuoliai buvo enukleuojami, fiksuojami 10 % neutraliame buferiniame formalino tirpale ir dvi dienas laikomi kambario temperatūroje. Vėliau atliekamas pjūvis per ragenos centrą link regos nervo, išdžiovinti audiniai impregnuojami parafinu. Paruošti 5 μm storio centrinės akies dalies preparatai buvo dažomi hematoksilinu ir eozinu. Histologiniai pjūviai buvo analizuojami šviesaus lauko mikroskopu, registruojami „Scanscope GL“ („Aperio Technologies“, JAV) skeneriu. Ragenos pakitimai buvo vertinami lyginant su kontroline sveika triušio ragena.

3.3.2 Lazerinės sistemos parametrų pritaikymas *in vivo* eksperimentams

Pirmųjų *in vivo* eksperimentų tikslas buvo pritaikyti lazerinę sistemą miopinei FRK procedūrai, nustatyti ragenos abliacijos greitį ir optimalius lazerinės spinduliuotės parametrus, patikrinti procedūrų atkartojamumą bei parengti operacijos eigos ir gijimo vertinimo protokolus tolimesniems ragenos abliacijos femtosekundiniais 205 nm ir nanosekundiniais 193 nm impulsais tyrimams. Pirmajame *in vivo* tyrimų etape buvo atliktos 24 miopinės FRK procedūros femtosekundiniais impulsais, 4 miopinės abliacijos komercine eksimerine ArF lazerine sistema ir pademonstruota viena hipermetropinė transepitelinė abliacija femtosekundiniais impulsais (toliaregystės korekcija).

Atliekant abliacijos eksperimentus buvo pastebėta, kad skiriasi *ex vivo* kiaulės ir *in vivo* triušio ragenos stromos abliacijos greičiai, todėl negalima tiesiogiai taikyti *ex vivo* kiaulių ragenose nustatytų parametrų. Pachimetru matuojant centrinį triušio ragenos storį prieš abliaciją ir po jos, matavimų rezultatai prastai atsikartodavo. Todėl triušio ragenos abliacijos greičio įvertinimui buvo nuspręsta atlikti „šulinio“ pavidalo abliaciją iki perforacijos (ragena pažeidžiama kiaurai).

Abliacijos greičio nustatymas. Atkartojama ir kontroliuojama refrakcijos pokyčio formavimo procedūra *in vivo* triušių ragenose gali būti atlikta tik žinant, kokio storio ragenos sluoksnis pašalinamas. Radus vienu skenavimo sluoksniu pašalinamos ragenos storį, galima tiksliai sumodeliuoti abliuojamą erdvinį darinį, kuris atitiktų konkretų refrakcijos pokytį. Taip

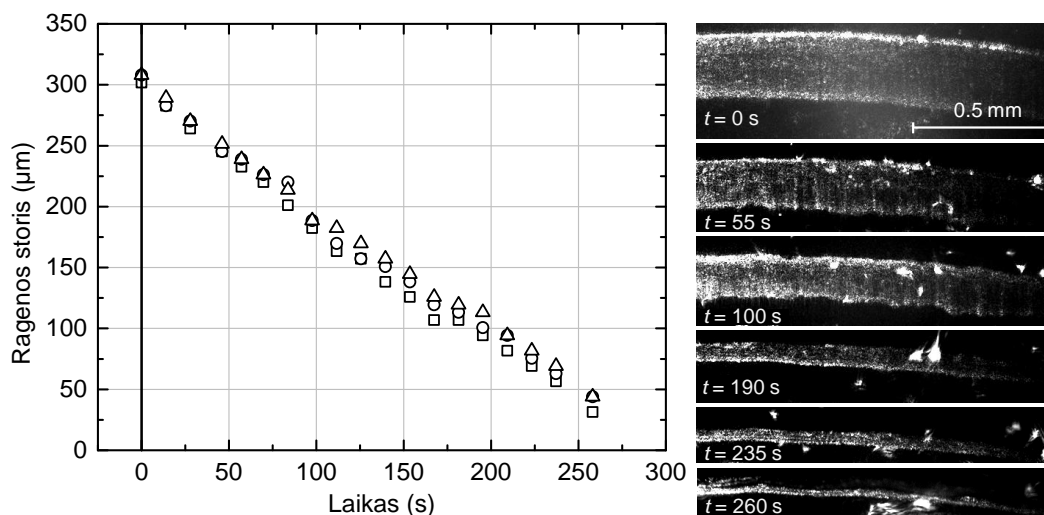
3. Ragenos abliacija

pat svarbu žinoti, ar abliacijos greitis paviršiniuose ir gilesniuose stromos sluoksniuose yra vienodas.

Iš pirmųjų *in vivo* triušių ragenų abliacijos tyrimų buvo pastebėta, kad, paveikus mechaniškai arba abliuojant lazerine spinduliuote, gyvo organizmo ragena dėl sudirginimo bei į operuojamą zoną patekusių skysčių ima tinti (paburksta). Ilgai laikant atvirą akį pastebimas ir priešingas efektas – ragena džiūsta ir jos storis mažėja. Todėl norint sužinoti, kokį ragenos kiekį pašaliname, neužtenka kontaktiniu būdu (pachimetru) išmatuoti ragenos storį prieš abliaciją ir po jos. Norint išsiaiškinti tikrąją ragenos audinio abliacijos spartą, triušio ragenoje buvo formuojamas 5,6 mm skersmens „šulinys“, šalinant skritulio pavidalo sluoksnius. Prieš eksperimentą pachimetru įvairiose vietose buvo išmatuotas ragenos storis. Eksperimentas buvo tęsiamas tol, kol ragena kažkurioje vietoje abliuojant pažeidžiama kiaurai. Žinant ragenos storį prieš operaciją ir padalinus šį storį iš abliacijos sluoksnių skaičiaus, randamas vienu sluoksniu pašalintos ragenos stromos storis.

Išmatuotas *in vivo* triušio ragenos storio kitimas abliacijos metu pateiktas 3.14 pav. Prieš abliavimą ragenos storis buvo $308 \mu\text{m}$, ragena pažeista kiaurai po 135 sluoksnių. Tai reiškia, kad vienu sluoksniu vidutiniškai buvo pašalinama $2,3 \mu\text{m}$ ragenos. Abliacijos metu lazerio impulsų pasikartojimo dažnis buvo $f = 20 \text{ kHz}$, energijos tankis Gauso pluošto centre $F = 0,13 \text{ J/cm}^2$, spinduliuotės vidutinė galia $P = 180 \text{ mW}$. Iš 3.14 pav. taip pat matyti, kad abliacijos greitis viso eksperimento metu išliko pastovus. Tai reiškia, kad skirtingame gylyje esantys ragenos sluoksniai abliuojami vienodu greičiu, todėl suformuoti įvairius erdvinius darinius ir koreguoti ragenos refrakciją galime lengvai, neįvesdami papildomų pataisų. 3.14 pav. dešinėje pateiktas ragenos skerspjūvis skirtingais laiko momentais, užfiksuotas 3.12 pav. pavažduota sistema. Matome, kad netgi pačioje procedūros pabaigoje ragenos paviršius išlieka gana lygus, o ragenos storis – pastovus visame skerspjūvyje.

Skysčių įtaka abliavimo greičiui. Jau seniai žinoma, kad, ragenos audinį pamerkus į vandenį ar druskos tirpalą, jis smarkiai ištinsta bei praranda pradinį skaidrumą [47, 48]. Dėl ypatingos ragenos audinio sandaros, absorbuojant skysčius ragena tinsta tik viena kryptimi – storėja [149]. Rentgeno spindulių bei neutronų difrakcijos tyrimo metodai parodė, kad, didėjant hidratacijos laipsniui, didėja atstumai tarp kolageno skaidulų (fibrilių) [150, 151]. Esant pakankamai nedideliame skysčio kiekiui, kolageno skaidulų skersmuo iš pradžių tolygiai didėja [152]. Kai skysčio kiekis pakankamai didelis, kolageno skaidulų skersmuo nustoja didėti, tačiau ragena



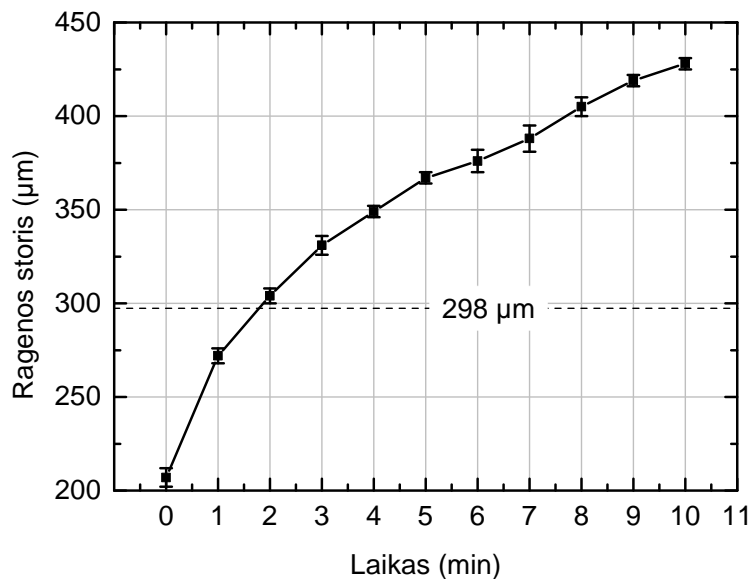
3.14 pav. *In vivo* triušio ragenos abliacijos femtosekundiniais impulsais dinamika. Skirtingi simboliai atitinka skirtingose ragenos vietose atliktus matavimus. Dešinėje pateiktas ragenos skerspjūvis skirtingais laiko momentais.

toliau tinsta, nes skystis yra sugeriamas kolageno skaidulus laikančių proteoglikanų matricoje. Toks plėtimasis nebėra tolygus – formuojasi zonos, kuriose nebėra kolageno [153]. Didelė UV spinduliuotės sugertis ragenoje siejama būtent su kolageno baltymu, todėl natūralu, kad abliacijos greitis bei ragenos paviršiaus kokybė po abliacijos smarkiai priklauso nuo šio baltymo pasiskirstymo ragenos tūryje.

Ragenos stromos tinimas turi neigiamą įtaką paviršiaus lygumui po operacijos [154]. Dėl skirtingo skysčio kiekio skirtingose ragenos vietose, abliacijos metu pašalinamas nevienodas ragenos storis, o dėl pabrinkimo gali pasikeisti ir ragenos abliacijos efektyvumas (šalinama ne tik ragena, bet ir joje esantis skystis) [155–157]. Dėl to operacijos baigtis sunkiai nuspėjama: sunku sukurti reikiamą refrakcijos pokytį, didėja ragenos paviršiaus nelygumai, kurie savo ruožtu taip pat daro neigiamą įtaką pooperaciniam gijimui [158].

FRK procedūrų metu, stebėdami ragenos skerspjūvį bei matuodami ragenų storį pachimetru prieš operaciją ir po jos, pastebėjome, kad operacijos metu ragenos storis keičiasi ne vien dėl lazerinės spinduliuotės poveikio. Itin akivaizdžiai ragenos storis kinta tada, kai ragena yra drėkinama BSS tirpalu. Po abliacijos sudrėkinta ragena iš karto pradeda tinti. Kai kada ragenos storis po kelių minučių viršija pradinį ragenos storį, kuris buvo išmatuotas dar prieš abliacijos procedūrą. Taip pat pastebėjome, kad ragena tinsta ne tik po abliacijos lazerio impulsais, bet ir po mechaninio epitelio šalinimo procedūros.

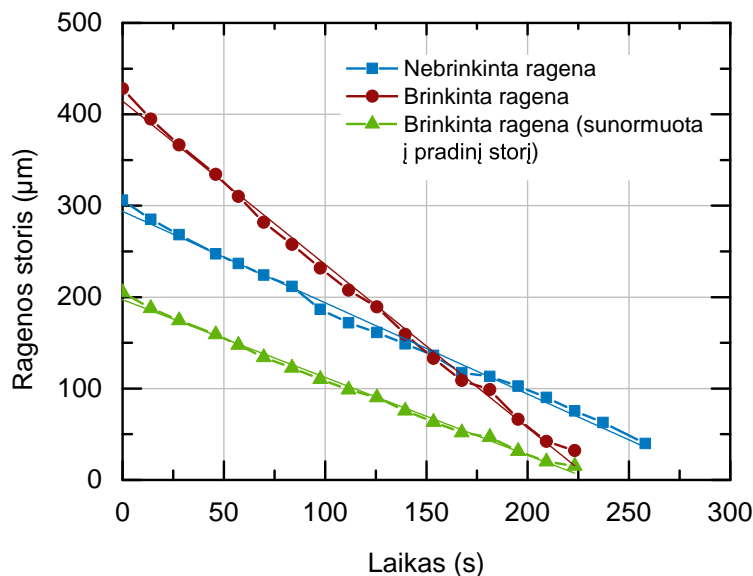
3. Ragenos abliacija



3.15 pav. *In vivo* triušio ragenos tinimas po abliacijos femtosekundine 205 nm bangos ilgio spinduliuote, drėkinant stromos paviršių BSS tirpalu. Ragenos storis prieš abliaciją ($298 \mu\text{m}$) pažymėtas brūkšnine linija.

Norėdami išsamiau ištirti, kaip kinta ragenos storis, kai stromos paviršius drėkinamas, ir kaip abliacijos greitis priklauso nuo vandens kiekio ragenoje, atlikome „šulinio“ pavidalo ragenos abliaciją. Lazerio spinduliuotės parametrai buvo identiški kaip ir prieš tai atliktame abliacijos greičio eksperimente. Vengdami papildomo mechaninio ragenos dirginimo atlikome transepitelinę $\sim 100 \mu\text{m}$ gylio abliaciją 5,6 mm skersmens zonoje. $298 \mu\text{m}$ storio ragena po abliacijos suplonėjo iki $207 \mu\text{m}$. Abliuotą ragenos paviršių 10 min. drėkinome BSS tirpalu ir kas minutę matavome ragenos storį pachimetru. *In vivo* triušio ragenos storio priklausomybė nuo laiko pavaizduota 3.15 pav. Kaip matyti iš šio paveikslėlio, drėkinamos ragenos storis per porą minučių pasiekė pradinę neabliuotos stromos storio vertę ($298 \mu\text{m}$), o po 10 min ragena buvo maždaug du kartus storesnė ($428 \mu\text{m}$) nei pradžioje ($207 \mu\text{m}$).

Po drėkinimo procedūros triušio akies rageną tolygiai abliavome 5,6 mm skersmens zonoje iki perforacijos ir, naudodami 3.12 pav. pavaizduotą plyšinio pašvietimo sistemą, filmavome ragenos storio kitimą. Gautus rezultatus palyginome su nedrėkintos ragenos abliacija tokiomis pačiomis sąlygomis (aprašyta ankstesniame skyrelyje). 3.16 pav. pateikiama brinkintos ir nebrinkintos triušio ragenos storio priklausomybė nuo laiko, abliuojant femtosekundiniais UV impulsais. Tam, kad būtų galima palyginti abliacijos spartą, matavimų duomenys buvo aproksimuoti tiesėmis, kurių polinkio kampas nusako abliacijos greitį. Mėlyna kreivė vaizduoja normalios (neišbrinkusios) triušio ragenos storio kitimą laike, raudona – brinkintos ragenos storio ki-



3.16 pav. Normalios triušio ragenos (mėlyna kreivė) ir brinkintos BSS tirpalu (raudona kreivė) storio kitimas abliuojant femtosekundiniais UV impulsais. Žalia kreivė iliustruoja brinkintos ragenos storio kitimą, sunormuotą į pradinį ragenos storį prieš brinkinimą. Matavimų rezultatai aproksimuoti tiesėmis.

timą abliacijos metu, o žalia kreivė atitinka tos pačios išbrinkintos ragenos storio kitimą, sunormuotą į ragenos storį prieš brinkinimą ($207 \mu\text{m}$).

Aproksimavę matavimų duomenis tiesėmis nustatėme, kad $5,6 \text{ mm}$ skersmens plote normali (nebrinkinta) rageną buvo šalinama $(1,00 \pm 0,02) \mu\text{m/s}$, o išbrinkusi – $(1,79 \pm 0,03) \mu\text{m/s}$ greičiu. Iš šių rezultatų galima daryti išvadą, kad, vertinant bendrą pašalintą ragenos audinio ir jame esančio skysčio tūrį, išbrinkusi triušio rageną femtosekundiniais impulsais abliuojama greičiau nei neišbrinkusi. Tai paaiškina ir mūsų stebėtą *ex vivo* kiaulės ir *in vivo* triušio ragenų abliacijos greičių skirtumą – skysčių apykaitos balansas *ex vivo* akyse yra sutrikęs (ragenos išbrinkusios), todėl abliacijos greitis *ex vivo* kiaulių ragenose yra maždaug du kartus didesnis nei *in vivo* triušių ragenose. Būtent todėl *ex vivo* eksperimentų rezultatai negali būti tiesiogiai pritaikyti praktikoje ir *in vivo* tyrimai yra būtini.

Grįžkime prie *in vivo* ragenos abliacijos greičio. Svarbiausia užduotis formuojant refrakcijos pokytį – pašalinti reikiamą ragenos audinio kiekį, kuris užtikrintų tinkamą refrakcinės ydos korekciją po operacijos, kai skysčių apykaita ragenoje yra normali. Todėl, vertinant abliacijos greitį, reikia atmesti ragenos absorbuoto skysčio įtaką, t. y. išbrinkusios ragenos storį būtina sunormuoti į prieš brinkinimą išmatuotą vertę (žr. 3.16 pav., raudona ir žalia kreivės). Tai padarę gauname, kad išbrinkusios ragenos abliacijos greitis, atmetus skysčių įtaką, yra $(0,85 \pm 0,01) \mu\text{m/s}$, t. y. mažesnis nei nebrinkin-

3. Ragenos abliacija

tos ($1,00 \mu\text{m/s}$). Smarkiai hidratuotos ragenos abliacijos greičio sumažėjimą galima paaiškinti tuo, jog dalis impulso energijos sunaudojama papildomo skysčio pašalinimui [146]. Verta pastebėti, kad šiame mūsų eksperimente, dirbtinai drėkinant akies paviršių, buvo sukurtos ekstremalios sąlygos (akies paviršius 10 min. laikomas užpildas BSS tirpalu), kurios visiškai neatitinka realių standartinės lazerinės refrakcijos korekcijos procedūros sąlygų. Todėl drąsiai galima teigti, kad atliekant refrakcinių ydų korekciją femtosekundiniais 205 nm impulsais, dėl perteklinių skysčių arba ragenos išsausėjimo, abliacijos greitis neturėtų pasikeisti daugiau nei 10 %.

1994 m. P. J. Dougherty su bendraautoriais, atlikdami galvijų ragenų abliacijos eksimerinio ArF lazerio impulsais eksperimentus, taip pat nustatė, kad abliacijos greitis priklauso nuo ragenos hidratacijos lygio – didėjant vandens kiekiui, abliacijos greitis mažėja [155]. Nors yra žinoma, kad viršutiniuose ragenos sluoksniuose vandens kiekis yra mažesnis nei giliuosiuose sluoksniuose [46, 47], tačiau mūsų *ex vivo* abliacijos eksperimentai tokios tendencijos nerodo – ragenos stromos abliacijos femtosekundiniais UV impulsais greitis išlieka pastovus ir nepriklauso nuo abliacijos gylio. Todėl galime teigti, kad hidratacijos pokytis per visą ragenos storį yra pakankamai mažas ir nedaro pastebimos įtakos abliacijos greičiui. O tai yra labai svarbu, nes atliekant tiek mažo, tiek didelio gylio abliacijas femtosekundiniais UV impulsais, galima tikėtis atkartojamų refrakcinių ydų korekcijos rezultatų.

Imuninio atsako įtaka gijimui. Iš pirmajame tyrimų etape, kurio tikslas buvo parinkti lazerinės sistemos parametrus, atliktų FRK procedūrų rezultatų pastebėjome, kad triušių ragenos gijimas gana smarkiai priklauso nuo konkretaus individo imuninio atsako. Po vienodų abliacijos procedūrų skirtingų triušių akys gijo skirtingai, o to paties individo ragenos gijo panašiai net tada, kai abiejose akyse buvo atliktos skirtingos procedūros. Tokios individualios triušių gijimo tendencijos daro gana didelę įtaką bendriems rezultatams, ypač kai tarpusavyje lyginama mažų tiriamųjų grupių gijimo rezultatai. Norint gauti patikimus rezultatus, vienos tiriamosios grupės operuotų triušių akių skaičius turi būti pakankamai didelis (bent 10–20, atsižvelgiant dar į tai, kad gali pasitaikyti komplikacijų ir dalis akių nebus įtraukiama į bendrus rezultatus). Stengdamiesi sumažinti skirtingų individų imuninio atsako įtaką bendriems gijimo rezultatams kai kuriuose FRK tyrimuose vienam triušiui skirtingose akyse atlikome skirtingas tiriamąsias procedūras. Šį būdą taikėme lygindami femtosekundiniais 205 nm ir nanosekundiniais 193 nm impulsais atliktas FRK procedūras. Tačiau visiškai

išvengti individualaus triušio gijimo įtakos visų tyrimų rezultatams mums nepavyko dėl gana didelio skaičiaus skirtingų tiriamųjų procedūrų bei riboto triušių skaičiaus.

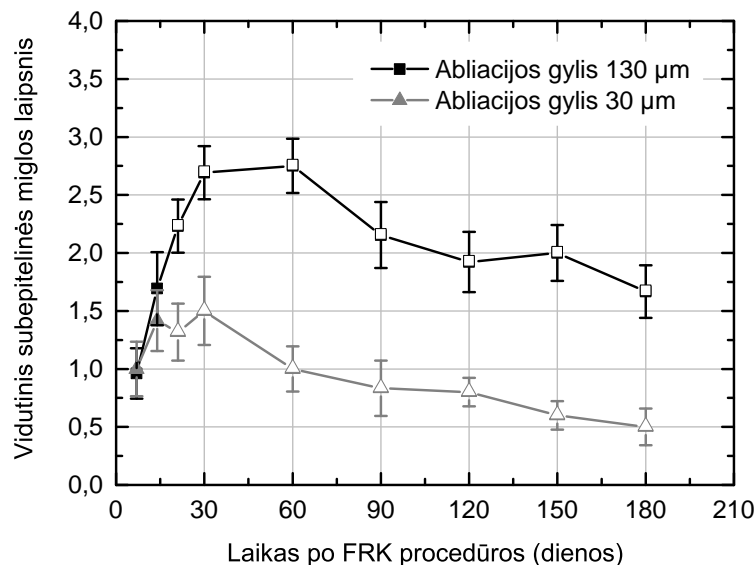
Atsižvelgdami į šiame skyriuje aprašytus rezultatus, suformulavome keletą gairių, kurių reikėtų laikytis norint operacijos metu suformuoti prognozuojamą refrakcijos pokytį bei išlaikyti lygų stromos paviršių po abliacijos: 1) operacijos metu turi būti kontroliuojamas operacinių skysčių kiekis, 2) priešoperacinis pasiruošimas turi trukti kiek galima trumpiau ir 3) prieš stromos abliaciją reikia vengti bet kokio bereikalingo mechaninio ragenos dirginimo. Šių gairių laikėmės atlikdami 3.3.3 ir 3.3.4 skyriuose aprašomus FRK ir TransFRK eksperimentus.

3.3.3 Fotorefrakcinė keratektomija

Siekdami išsiaiškinti, kaip gyja triušių ragenos po abliacijos femtosekundiniais UV impulsais, atlikome skirtingų gylių – 130 μm ir 30 μm – miopijos korekcijos procedūras. Po abiejų procedūrų stromos paviršiaus lygumas, apžiūrėjus ragenas mikroskopu, atrodė panašiai. Tam, kad stromos paviršiaus lygumas būtų įvertintas nuodugniau, dviejų triušių akys (dvi po gilios ir dvi po negilios abliacijos) iš karto po operacijos buvo paimtos histologiniams tyrimams. Šviesaus lauko mikroskopinė histologinių preparatų analizė jokių esminių skirtumų tarp abliuotų ragenų paviršių taip pat neparodė. Tiek po gilios, tiek po negilios abliacijos paviršiniame ragenos sluoksnyje šiluminių stromos pažeidimų nepastebėta.

Po operacijos iki 6 mėnesių sekėme, kaip kinta triušių ragenos subepitelinės miglos intensyvumas. Iš viso buvo stebėta 16 akių po 30 μm ir 14 akių po 130 μm gylio miopinės abliacijos. Subepitelinės miglos intensyvumą vertinome tik normaliai gyjančioms ragenoms, t. y. kurios po operacijos reepitelizavosi per 7 dienas ir kuriose nebuvo uždegiminių reakcijų požymių. Per lėta reepitelizacija buvo stebėta vienoje akyje po gilios abliacijos ir dviejose po negilios abliacijos. Taip pat, vertinant subepitelinę miglą, neįtraukta viena akis iš gilios abliacijos grupės dėl pastebėto infiltrato ir viena iš negilios abliacijos grupės dėl trečią savaitę atsiradusio keratito. Šios komplikacijos galėjo atsirasti dėl to, kad mūsų tyrimų laboratorijoje nebuvo užtikrintos sterilios sąlygos, o ragenos imobilizavimui naudotas daugkartinis siurbtukas. Kaip ir buvo galima tikėtis, po gilesnės abliacijos ragenos drumstėsi intensyviau nei po negilios abliacijos (3.17 pav.). Pirmąjį mėnesį abiejų triušių grupių subepitelinė ragenos migla intensyvėjo, praėjus mėnesiui po operacijos drumstis buvo intensyviausia, o vėliau ragenos laipsniškai skaidrėjo.

3. Ragenos abliacija

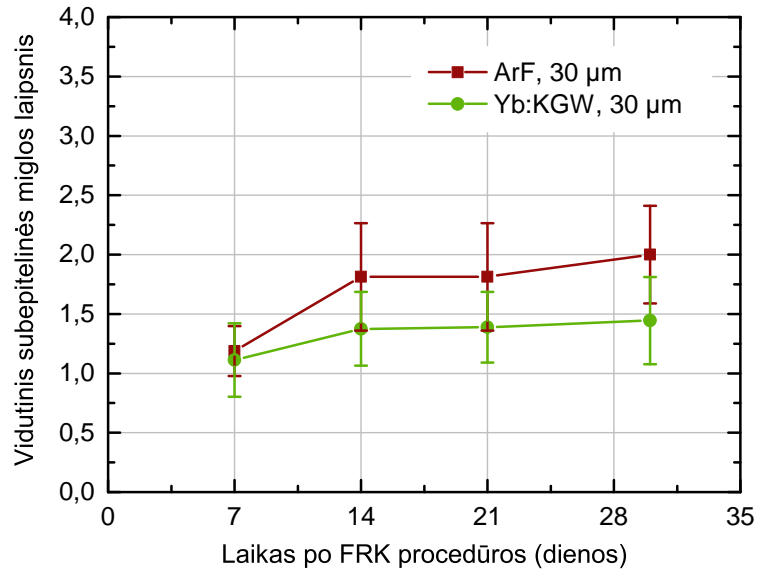


3.17 pav. Vidutinės subepitelinės miglos dinamika po giles 130 μm (juoda spalva) ir negilos 30 μm (pilka spalva) miopinės FRK procedūros femtosekundiniais UV impulsais. Statistiškai besiskiriantys duomenys pažymėti tuščiaaviduriais simboliais.

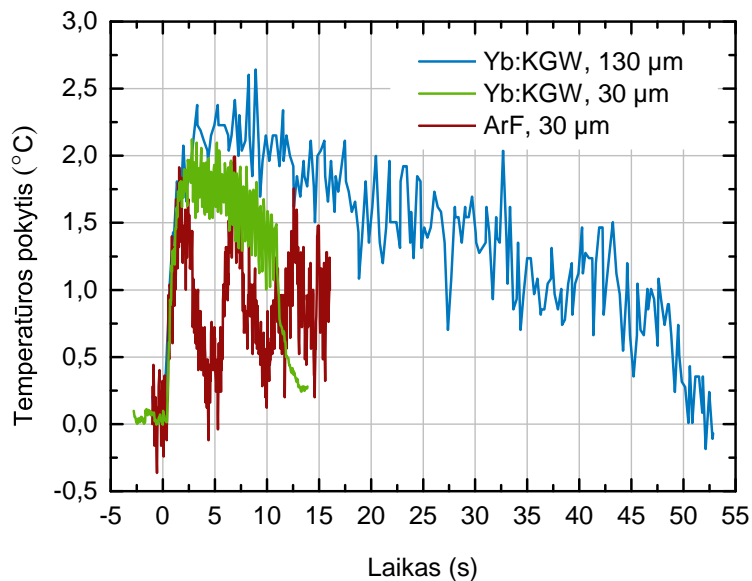
Tokia triušio ragenos gijimo eiga būdinga ir po abliacijos eksimeriniu ArF lazeriu [52]. Pagal Mann–Whitney statistinį testą įvertinus gijimo rezultatus, statistiškai reikšmingas vidutinio subepitelinės miglos intensyvumo skirtumas ($p = 0,05$) tarp abiejų tiriamųjų grupių stebėtas nuo trečios savaitės iki stebėjimo pabaigos (6 mėn.).

Pasibaigus gijimo stebėjimo laikotarpiui 11 akių po giles ir 6 akys po negilos abliacijos buvo enukleuotos histologinei analizei. Po gilesnės abliacijos kai kuriuose histologiniuose pjūviuose buvo stebimas storesnis subepitelinės fibrozės sluoksnis. Tai patvirtina ir subepitelinės miglos vertinimo rezultatus. Daugiau esminių skirtumų tarp abiejų grupių atlikus histologinę analizę nebuvo pastebėta. Keliose ragenose iš abiejų tiriamųjų grupių buvo užregistruota nežymi epitelio pamatinių (kurios yra arčiausiai stromos) ląstelių edema. Gilesniuose stromos sluoksniuose, Descemeto membranoje ir endotelyje patologinių pakitimų nepastebėta.

Antroji tyrimo dalis buvo skirta palyginti femtosekundiniais UV impulsais (205 nm) ir komercine nanosekundine eksimerine ArF lazerine sistema (193 nm) atliktas vienodo abliacijos gylio miopinės FRK procedūras. Devyniems triušiams vienoje akyje atlikome miopinę 30 μm gylio abliaciją femtosekundiniais impulsais, kitoje akyje – tokio pat gylio abliaciją nanosekundiniais impulsais. Vienoje akyje po femtosekundinės, ir vienoje po nanosekundinės abliacijos išsivystė keratitas, todėl subepitelinė migla buvo vertinama tik 8 akims iš kiekvienos grupės. Subepitelinė migla stebėta vieną



3.18 pav. Vidutinės subepitelinės miglos dinamika po 30 μm gylio miopinės FRK procedūros femtosekundiniais Yb:KGW lazerio penktosios harmonikos (žalia spalva) ir tokio pat gylio abliacijos nanosekundiniais eksimerinio ArF lazerio (raudona spalva) impulsais.



3.19 pav. Triušio ragenos paviršiaus temperatūros pokytis FRK procedūros metu: 130 μm (mėlyna kreivė) ir 30 μm (žalia kreivė) gylio miopinė abliacija femtosekundiniais UV impulsais, bei 30 μm (raudona kreivė) gylio miopinė abliacija nanosekundiniais eksimerinio ArF lazerio impulsais.

mėnesį po operacijos, iki kol pasiekiamas intensyviausias ragenos drumstumas [52]. Vidutinė subepitelinė migla visą stebėjimo laikotarpį buvo šiek tiek intensyvesnė eksimeriniu ArF lazeriu operuotose akyse (žr. 3.18 pav.), tačiau statistiškai gijimo rezultatai nesiskyrė ($p = 0,05$).

Praėjus mėnesiui po operacijos triušių akys buvo enukleuotos histolo-

3. Ragenos abliacija

gijai. Šviesaus lauko histologinių preparatų mikroskopija neparodė esminių skirtumų tarp ragenų, operuotų femtosekundiniais (205 nm) ir nanosekundiniais (193 nm) impulsais. Femtosekundiniais UV impulsais operuotose akyse epitelis buvo normalus, tik vienoje akyje pastebėta epitelio hiperplazija. Iš septynių nanosekundiniu lazeriu operuotų ragenų trijose rasti lokalūs išplėnėjimai (atrofija), vienoje ragenoje – nedidelė epitelio pamatinių ląstelių edema. Abiem lazeriais operuotų ragenų, kuriose buvo užfiksuota intensyvesnė subepitelinė migla, histologiniuose pjūviuose buvo matyti panašios struktūros ir panašaus storio subepitelinės fibrozės sluoksniai.

FRK procedūrų metu IR spindulių kamera buvo stebima ragenos paviršiaus temperatūra. Ragenos temperatūros pokyčiai giliai (130 μm) ir negilios (30 μm) abliacijos femtosekundiniais 205 nm impulsais bei 30 μm gylio abliacijos nanosekundiniais eksimerinio ArF 193 nm lazerio impulsais metu pateikti 3.19 pav. Kaip matyti iš šio grafiko, atliekant 30 μm gylio abliaciją tiek ArF (raudona linija), tiek Yb:KGW lazerio penktosios harmonikos impulsais (žalia linija), maksimalus ragenos temperatūros pokytis siekė 2 °C. Taip pat verta atkreipti dėmesį į tai, kad eksimerinio ArF lazerio spinduliuotė FRK procedūros metu buvo periodiškai išjungiamą, todėl ragena turėjo laiko atvėsti (3.19 pav., raudona linija). Tuo tarpu, abliuojant femtosekundiniais UV impulsais, FRK procedūra buvo atlikta be pauzių.

Miopinė 30 μm gylio abliacija 5 mm skersmens optinėje zonoje su 0,5 mm perėjimo zona iš viso truko 11 s. Tokio gylio abliacija 5 mm optinėje zonoje pašalintu ragenos tūriu atitinka 3,0 D refrakcijos korekcijos procedūrą. Tai reiškia, kad femtosekundiniais impulsais 1,0 D refrakcijos pokytis suformuojamas per 3,7 s. Ši trukmė yra artima mūsų naudotos eksimerinės ArF lazerinės sistemos abliacijos spartai (3,0 D per 10 s, jeigu neįskaičiuojame pauzių FRK procedūros metu). Tačiau šiuolaikinės komercinės eksimerinės ArF lazerinės sistemos yra kur kas greitesnės – abliacijos sparta formuojant miopiją koreguojantį refrakcijos pokytį 6 mm optinėje zonoje siekia 1,3 s/D [90].

3.3.4 Transepitelinė fotorefrakcinė keratektomija

Ši *in vivo* eksperimentų serija buvo skirta išsiaiškinti, kaip gyja triušių ragenos po giliai abliacijos femtosekundiniais impulsais, kai abliacijos sparta yra dar didesnė. Šiam tikslui buvo atlikti eksperimentai su 33 triušiais. Dvi triušių akys naudotos epitelio abliacijos proceso charakterizavimui, 20 akių atlikta nepertraukiama $\sim 110 \mu\text{m}$ gylio TransFRK procedūra, 12 akių operuotos komercine eksimerine ArF lazerine sistema bei 8 akys operuotos mo-

difikavus femtosekundinę TransFRK procedūrą, imituojant eksimerinio lazerio abliacijos protokolą. Histologinei analizei iš karto po operacijos buvo paimtos 2 akys po eksimerinio ArF lazerio abliacijos ir 3 akys po modifikuotos TransFRK procedūros. TransFRK abliacijos procedūra tyrimams buvo pasirinkta dėl keleto priežasčių.

Pirma, ši procedūra leidžia imituoti sudėtingiausias FRK procedūros sąlygas: atliekant gilią transepitelinę abliaciją lazeriu pašalinamas žymiai didesnis ragenos audinio tūris nei atliekant įprastą FRK procedūrą. Didinant abliacijos gylį (didėjant lazerio impulsų skaičiui), abliuojamo paviršiaus nelygumai auga [159, 160]. Maža to, išauga procedūros trukmė, o kartu ir maksimali ragenos paviršiaus temperatūra. Ragenos paviršiaus temperatūros pokytis abliacijos metu bei paviršiaus kokybė po abliacijos yra labai svarbūs gijimo procesui [160–164]. Todėl, atliekant gilią transepitelinę abliaciją, mes galime įvertinti patį blogiausią gijimo scenarijų – didelis pašalintų audinių kiekis, maksimali ragenos temperatūra, didžiausi ragenos stromos paviršiaus nelygumai.

Antra, kitaip nei nuvalant epitelį mechaniškai, transepitelinės abliacijos metu visiems triušiams epitelis šalinamas vienodomis sąlygomis – simetriškoje, vienodo skersmens zonoje, vienodą laiko tarpą, be papildomo mechaninio dirginimo. Todėl sumažinama pašalinių veiksnių įtaka gijimui.

Trečia, kadangi nebereikia epitelio šalinti mechaniškai, o taip pat epitelio ir stromos abliacija atliekama viena po kitos, be stabdymų, sutrumpėja bendra procedūros trukmė ir sumažėja infekcijos rizika. Šis veiksnys buvo itin aktualus, nes abliacija femtosekundiniais UV impulsais buvo atliekama ne sterilioje operacinėje, o įprastoje laboratorinėje patalpoje.

Ketvirta, kadangi epitelio nereikia šalinti mechaniškai, išvengiama papildomo ragenos tinimo, kuris savo ruožtu gali turėti įtakos refrakcijos korekcijos rezultatams.

Procedūros. Femtosekundiniais UV impulsais atlikome nepertraukiamą 110 μm gylio TransFRK procedūrą, epitelį pašalinome 6,6 mm zonoje, o refrakcijos pokytį formavome 6 mm skersmens optinėje zonoje (abliacijos metu suformuojamo darinio profilis pavaizduotas 3.11 pav.). Atsižvelgdami į vidutinį triušio epitelio storį (32,2–47,7 μm [34, 55, 165–168]) įvertinome, kad 110 μm gylio abliacijos metu pašalinamos stromos storis turėtų būti 60–80 μm . Pagal pašalinamos stromos storį galima įvertinti apytikslį miopinės abliacijos refrakcijos pokytį – kai 6 mm optinėje zonoje centrinis abliacijos gylis 70 μm , tai sukuriamas $\sim 5,0$ D refrakcijos pokytis. Laiką, per kurį fem-

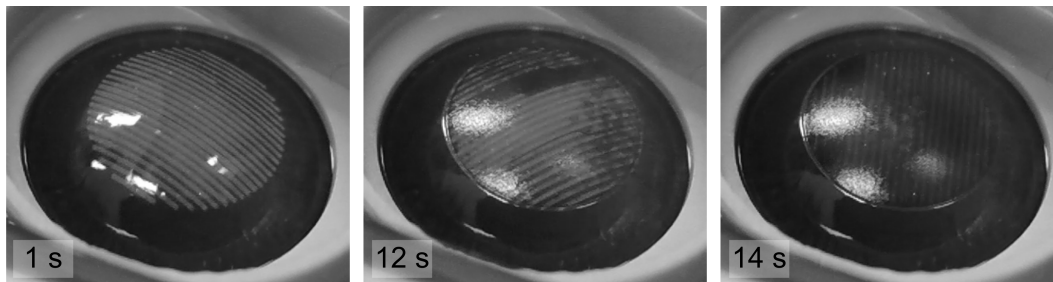
3. Ragenos abliacija

tosekundiniais impulsais 6 mm skersmens zonoje visiškai pašalinamas epitelis, nustatėme stebėdami ragenos liuminescencijos kitimą abliacijos metu. Tam atlikome miopinę transepitelinę abliaciją dviejose triušio akyse. Ragenos liuminescencija buvo registruojama filmuojant skaitmeniniu fotoaparatu „COOLPIX P310“ („Nikon“, Japonija). Pagal liuminescencijos pokytį įvertinome epitelio pašalinimo laiką bei parengėme abliacijos protokolą 110 μm gylio TransFRK procedūrai: 15 s tolygiai šalinamas epitelis, 8 s ragenos stromoje formuojamas refrakcijos pokytis.

Tam, kad galėtume atkartoti analogišką transepitelinę abliaciją komercinė eksimerine ArF lazerine sistema, turėjome išsiaiškinti, kokį stromos abliacijos gylio ekvivalentą reikia nustatyti FTK procedūros metu, kad epitelis būtų visiškai pašalintas 6 mm optinėje zonoje. Todėl dviejose ragenose, atlikdami didelio gylio FTK procedūrą, registravome liuminescencijos pokytį. Nustatėme, kad epitelio liuminescencija smarkiai sumažėja atlikus 55 μm gylio FTK procedūrą. Atsižvelgdami į tai, suformulavome transepitelinės abliacijos protokolą eksimerinei ArF lazerinei sistemai: iš pradžių atliekama 55 μm gylio FTK procedūra 6,6 mm skersmens zonoje, o tada atliekama miopinė 70 μm gylio FRK procedūra „PlanoScan“ režimu (refrakcijos pokytis skaičiuojamas ne pagal individualų, bet pagal standartinį keratometrijos dydį, t. y. 43,3 D). Naudota eksimerinė lazerinė sistema pagal gamintojo nustatytą protokolą įterpia privalomas periodines pauzes į abliacijos algoritmą. Dėl šios priežasties FTK procedūros metu lazerio spinduliuotė 7 kartus buvo išjungta maždaug 2 s, o refrakcijos pokyčio formavimo metu – 3 kartus po ~ 2 s. Eksimerinės sistemos parametrų pakeitimas tarp FTK ir FRK procedūrų užtrukdavo apie 3 min.

Ragenos storio matavimo rezultatai po abliacijos eksimeriniu ArF lazeriu mus nustebino – įvertintas vidutinis abliacijos gylis buvo $151,4 \pm 19,7 \mu\text{m}$, vietoje planuoto 110 μm (priežastys aptariamos 3.4 skyrelyje). Todėl nutarėme pakartoti femtosekundinę abliaciją, modifikuodami abliacijos algoritmą taip, kad procedūra būtų kaip galima artimesnė eksimerinio lazerio abliacijai: įterpėme atitinkamas pauzes į abliacijos algoritmą (7 pauzės po 2 s epitelio abliacijoje, 3 min pauzė tarp epitelio ir stromos abliacijos ir 3 pauzės po 2 s refrakcijos pokyčio formavimo etape) bei pagilinome stromos abliaciją tiek, kad bendras TransFRK procedūros gylis būtų 150 μm , t. y. artimas vidutiniam eksimerinio lazerio abliacijos gyliui.

Epitelio abliacija. TransFRK procedūrų metu nufilmavome vienuolikos triušių ragenų liuminescencijos dinamikas. Analizuodami video medžiagą,

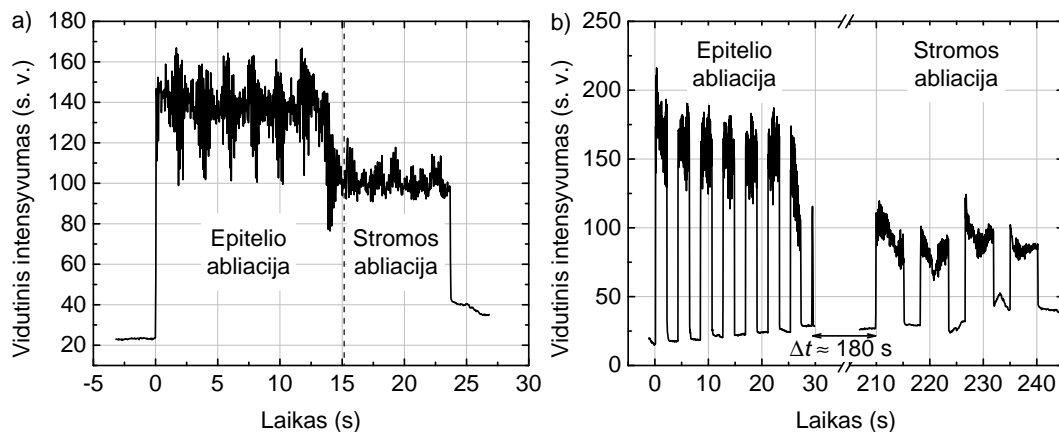


3.20 pav. Triušio ragenos liuminescencijos pokytis femtosekundinės nestabdomos $110\ \mu\text{m}$ gylio TransFRK procedūros metu.

vertinome, kaip tiksliai pašalinamas epitelis, stebėjome epitelio sluoksnio tolygumą bei skirtingų triušių epitelio storio variacijas. 3.20 pav. parodyta, kaip keičiasi triušio ragenos audinio liuminescencija abliuojant femtosekundiniais UV impulsais. Iš nuotraukų matyti, kad ragenos epitelis ($t = 1\ \text{s}$) liuminescuoja žymiai intensyviau nei stroma ($t = 14\ \text{s}$). Taip pat, iš viduriniajame paveikslėlyje ($t = 12\ \text{s}$) užfiksuoto netolygaus liuminescencijos intensyvumo pasiskirstymo (tuo metu, kai pasiekama epitelio ir stromos riba) matyti, jog ragenos epitelio storis visoje $6,6\ \text{mm}$ abliacijos zonoje nėra pastovus. 3.20 pav. pateiktu atveju epitelis storesnis ragenos centrinėje dalyje. Tačiau, išanalizavus 11 akių abliacijų duomenis, bendra epitelio storio netolygumų tendencija nebuvo pastebėta – vieta, kurioje epitelio ląstelių sluoksnis storiasias, buvo stebima skirtingose abliacijos zonos vietose. Taip pat reikia paminėti, kad abliacijos metu stebėtas liuminescencijos intensyvumo pokytis nebuvo vienintelis indikatorius, pagal kurį sprendėme, ar epitelis visiškai pašalintas. Abliacijos metu, pasiekus epitelio ir stromos ribą, kartu su liuminescencijos sumažėjimu buvo stebimas šuoliškas ragenos paviršiaus kokybės pasikeitimas – iš blizgančio (epitelis) į šviesą sklaidantį (stroma). Tai matyti ir 3.20 pav., lyginant lempos atspindžius nuo ragenos paviršiaus laiko momentais $t = 1\ \text{s}$ ir $t = 14\ \text{s}$.

Laikas, per kurį pašalinamas epitelis, buvo vertinamas analizuojant filmuotą medžiagą. Video kadrai buvo išskaidyti į raudoną, žalią ir mėlyną kanalus. Epitelio liuminescencija intensyviausia mėlynojoje spektro dalyje ($400\text{--}500\ \text{nm}$) [169, 170], todėl tolimesnei analizei buvo imamas tik mėlynas kanalas. Pažymėjus abliacijos zoną elipse, visų toje zonoje esančių taškų intensyvumas buvo suvidurkintas ir gauta suintegruota santykinė liuminescencijos intensyvumo vertė. Atlikus tokią analizę visiems video kadrams, buvo gauta liuminescencijos intensyvumo priklausomybė nuo laiko (3.21 pav.). Išanalizavus 11 video įrašų iš triušiams atliktų TransFRK procedūrų, buvo įvertinta, per kiek laiko pasiekama ragenos stroma ir

3. Ragenos abliacija

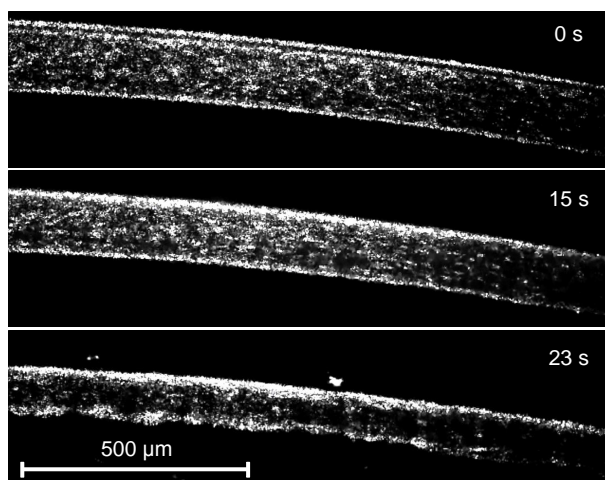


3.21 pav. Triušio ragenos liuminescencijos kitimas laike atliekant a) femtosekundinę nestabdomą $110\ \mu\text{m}$ gylio TransFRK ir b) $150\ \mu\text{m}$ gylio TransFRK su pauzėmis.

kada visiškai pašalinamas epitelis visoje $6,6\ \text{mm}$ abliacijos zonoje. Nustatyta, kad $6,6\ \text{mm}$ skersmens abliacijos zonoje ragenos stroma pasiekama vidutiniškai per $(13,2 \pm 1,3)\ \text{s}$, o epitelis visiškai pašalinamas per $(15,0 \pm 0,8)\ \text{s}$. Perskaičiavus procentais nuo triušio epitelio storio vidutinės vertės, gaunama, kad epitelio storio variacijos $6,6\ \text{mm}$ zonoje siekia $(12 \pm 5)\ \%$. Mes neturėjome techninių galimybių tiksliai išmatuoti triušių epitelio storio, todėl epitelio abliacijos greitį vertinome tik atsižvelgdami į literatūroje pateiktas vidutines triušio epitelio storio vertes, kurių diapazonas $32,2\text{--}47,7\ \mu\text{m}$ [34, 55, 165–168]. Pagal tai galima įvertinti, kad triušio epitelio abliacijos femtosekundiniais $205\ \text{nm}$ bangos ilgio impulsais sparta yra tarp $0,186 \times 10^6\ \mu\text{m}^3/\text{mJ}$ ir $0,275 \times 10^6\ \mu\text{m}^3/\text{mJ}$.

Triušio ragenos storio kitimą laike stebėjome naudodami 3.12 pav. pavaizduotą plyšinio pašvietimo sistemą. Ragenos skerspjuvio vaizdai femtosekundinės $110\ \mu\text{m}$ gylio TransFRK procedūros metu pateikti 3.22 pav. Kaip matyti iš paveikslėlio, laiko momentu $t = 0\ \text{s}$ ragenos viršuje matomas plonas epitelio sluoksnis, kuris visiškai dingsta po epitelio šalinimo etapo ($t = 15\ \text{s}$). TransFRK procedūros pabaigoje ($t = 23\ \text{s}$) ragena akivaizdžiai suplonėjusi, o stromos paviršius išlieka lygus.

Kaip matyti iš 3.21 pav., ragenos liuminescencijos registravimas leidžia gana tiksliai įvertinti, kada abliuojant pasiekama epitelio ir stromos riba. Kadangi liuminescencijos registravimui reikia tik CCD kameros, toks metodas galėtų būti naudojamas realiuoju laiku. Tai leistų ne tik tiksliai nustatyti epitelio ir stromos ribą ir kartu išsaugoti maksimalų ragenos storį po operacijos, bet ir įvertinti paciento epitelio sluoksnio netolygumus. Kaip jau minėta, epitelio ląstelės atlieka ragenos glotninimo funkciją, dėl to epi-



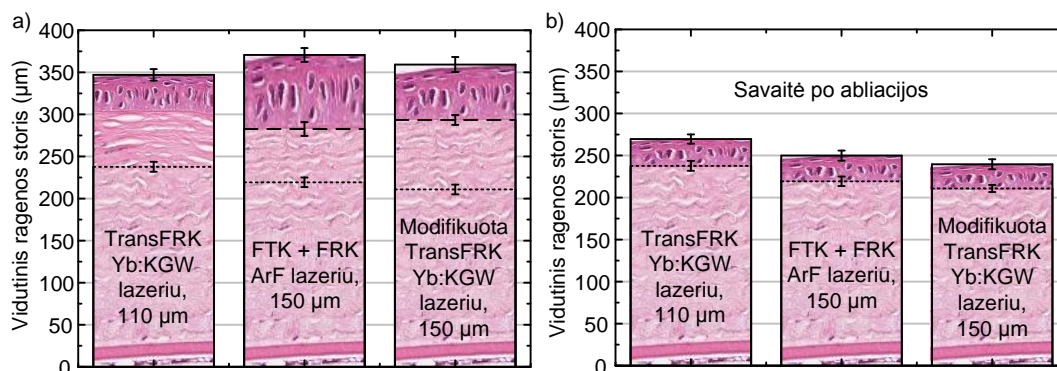
3.22 pav. Ragenos skerspjūvis femtosekundinės $110\ \mu\text{m}$ gylio TransFRK procedūros metu.

telio storio netolygumai iš tikrųjų tik atspindi ragenos stromos paviršiaus defektus. Todėl refrakcinės korekcijos procedūros metu registruojama ragenos liuminescencijos dinamika sudarytų galimybę ne tik tiksliai pašalinti epitelį, bet ir individualiai kiekvienam pacientui koreguoti stromos defektus.

Abliacijos sparta. Tam, kad galėtume įvertinti, kokią ragenos stromos audinio dalį vidutiniškai pašalinome kiekvienos iš procedūrų metu ($110\ \mu\text{m}$ ir $150\ \mu\text{m}$ gylio TransFRK abliacija femtosekundiniais impulsais bei $150\ \mu\text{m}$ gylio abliacija eksimerinio ArF lazerio nanosekundiniais impulsais), visiems triušiams pachimetru matavome ragenos centrinį storį. 3.23 pav., a dalyje grafiškai pateikiami apibendrinti centrinio ragenos storio matavimo rezultatai skirtingais procedūrų etapais (prieš abliaciją, po epitelio pašalinimo ir po stromos abliacijos), o 3.23 pav., b dalyje – ragenos storis po operacijos ir praėjus savaitei po operacijos (su ataugusiu epitelium). Kad būtų lengviau įsivaizduoti, histogramų stulpeliai iliustruojami kaip ragenos histologiniai pjūviai, kur viršutinis ląstelių sluoksnis yra epitelis, po juo – ragenos stroma (storiausias ragenos sluoksnis), o apačioje du ploni ragenos sluoksniai – Descemeto membrana ir endotelis (ragenos struktūra išsamiai aprašyta 1 skyriuje ir pavaizduota 1.2 pav.).

Kaip matyti iš 3.23 pav., šalinant epitelį eksimerinio ArF lazerio impulsais buvo nuabliuojamas žymiai storesnis ragenos sluoksnis nei femtosekundinių procedūrų metu. Priminsime, kad epitelio abliacijos etapo trukmę abiemis lazerinėms sistemoms parinkome vienodai – pagal mėlynos liuminescencijos intensyvumo sumažėjimą. Didesnis eksimeriniu ArF lazeriu pašalintų ragenos audinių kiekis gali būti susijęs su procedūros trukme – eksimerinė

3. Ragenos abliacija



3.23 pav. Vidutinio centrinio ragenos storio matavimų rezultatai a) skirtingais lazerinių procedūrų etapais: prieš procedūrą (visas stulpelio aukštis), pašalinus epitelį (brūkšninė linija) ir po stromos abliacijos (taškinė linija); b) po abliacijos procedūros (taškinė linija) ir praėjus savaitei po operacijos (visas stulpelio aukštis). Ties kiekviena vidutinio ragenos storio verte, viduryje stulpelio pateikiami atitinkami standartiniai nuokrypiai.

lazerinė sistema veikė su pauzėmis ir epitelio šalinimas truko žymiai ilgiau, nei atitinkama procedūra femtosekundiniais impulsais (atitinkamai ~ 69 s ir 15 s). Dėl to ragena galėjo išsausėti ir, dėl išgaravusio vandens, pasikeitė ragenos stromos storis. Faktą, kad eksimerinio lazerio impulsais pašalinus epitelį triušio ragena išsausėdavo, patvirtina ir tai, kad nei vienai ragenai negalėjome atlikti pachimetrijos nesudrėkinę matavimo zondo galiuko. Tuo tarpu po analogiškos ($150 \mu\text{m}$ gylio ir panašios trukmės) TransFRK procedūros femtosekundiniu lazeriu visi pachimetrijos matavimai atlikti nedrėkinant ragenos. Užregistruotas pašalintas ragenos storis po visos abliacijos eksimeriniu lazeriu taip pat buvo didesnis nei tikėtasi. Vietoje numatytų $110 \mu\text{m}$, įvertinę vidutinę abliacijos gylio vertę, gavome $151,4 \pm 19,7 \mu\text{m}$. Tokį didelį abliacijos gylio neatitikimą galėjo lemti keli veiksniai. Pirma, ragenos galėjo išsausėti dėl ilgos procedūros trukmės, šiluminio spinduliuotės poveikio ir sauso oro operacinėje patalpoje, o tai savo ruožtu galėjo daryti įtaką abliacijos greičiui [155–157]. Antra, pachimetrijos rezultatai galėjo būti iškraipyti dėl per stipraus pachimetro zondo įspaudimo į sausą ragena. Literatūroje aprašytas atvejis, kai žmonių ragenos pachimetrinių matavimų rezultatai po TransFRK procedūros taip pat gana smarkiai (28 %) neatitiko realaus abliacijos gylio. Šį neatitikimą autoriai siejo su ragenos dehidratacija ir procedūros trukme [171]. Trečia priežastis galėtų būti eksimerinės ArF lazerinės sistemos gamintojo įskaičiuota abliacijos gylio korekcija, kuri yra įvertinta statistiškai, pagal sugijusios žmogaus akies vidutinį refrakcijos pokytį [172].

Tiksliau pašalintos ragenos stromos storio pokytį galima įvertinti lygi-

nant ragenos storį po operacijos su ragenos storiu po reepitelizacijos, kai hidratacijos lygis tampa normalus. Lygindami ragenos storio vidurkį prieš operaciją ir praėjus vienai savaitei po jos, gavome, kad po femtosekundinių $110\ \mu\text{m}$ ir $150\ \mu\text{m}$ gylio TransFRK procedūrų pašalintos stromos storis buvo atitinkamai $75,8 \pm 23,3\ \mu\text{m}$ ir $119,6 \pm 28,3\ \mu\text{m}$. Įskaičius ataugusį triušio epitelio storį, šios vertės atitinka mūsų numatytą abliacijos gylį. Tokiu pačiu būdu apskaičiuotas eksimeriniu lazeriu pašalinto stromos sluoksnio storis buvo $120,8 \pm 17,4\ \mu\text{m}$.

Rezultatus galima apibendrinti taip: nors transepitelinei abliacijai iš pirmo karto nepavyko tinkamai parinkti eksimerinės ArF lazerinės sistemos parametrų, tačiau, pakeitę femtosekundinės Yb:KGW lazerinės sistemos abliacijos parametrus (įterpę pauzes ir padidinę abliacijos gylį), sugebėjome gana tiksliai atkartoti eksimerine sistema atliktas abliacijos procedūras:

- Vidutinis triušio ragenos storio pokytis po numatytos $150\ \mu\text{m}$ gylio TransFRK abliacijos femtosekundiniais $205\ \text{nm}$ impulsais buvo $148,4 \pm 15,9\ \mu\text{m}$, o po abliacijos nanosekundiniais $193\ \text{nm}$ impulsais – $151,4 \pm 19,7\ \mu\text{m}$,
- Vidutinis triušio ragenos storio pokytis praėjus savaitei po $150\ \mu\text{m}$ gylio TransFRK abliacijos femtosekundiniais $205\ \text{nm}$ impulsais buvo $119,6 \pm 28,3\ \mu\text{m}$, o po abliacijos nanosekundiniais $193\ \text{nm}$ impulsais – $120,8 \pm 17,4\ \mu\text{m}$.

Įvertintas vidutinis centrinis triušio ragenos abliacijos gylis leidžia apytiksliai apskaičiuoti triušio ragenos abliacijos femtosekundiniais impulsais spartą. Naudojantis formulėmis (3.1) ir (3.2) ir žinant didžiausią abliacijos gylį Δy_m bei abliacijos zonos spindulį R , galima įvertinti sukurtą laužiamosios gebos pokytį ΔD . $110\ \mu\text{m}$ gylio TransFRK procedūros metu pašalintas ragenos stromos storis, apskaičiuotas iš centrinio ragenos storio matavimo prieš operaciją ir praėjus savaitei po operacijos rezultatų, atitinka $5,5\ D$ laužiamosios gebos pokytį. Kadangi stromos abliacija truko $8\ \text{s}$, tai abliacijos sparta buvo $1,45\ \text{s}/D$. Atitinkamai įvertinę laužiamosios gebos pokytį po gilios TransFRK procedūros ($150\ \mu\text{m}$) gavome, kad per $14\ \text{s}$ buvo suformuotas $8,7\ D$ laužiamosios gebos pokytis. Tai atitinka $1,61\ \text{s}/D$ abliacijos spartą.

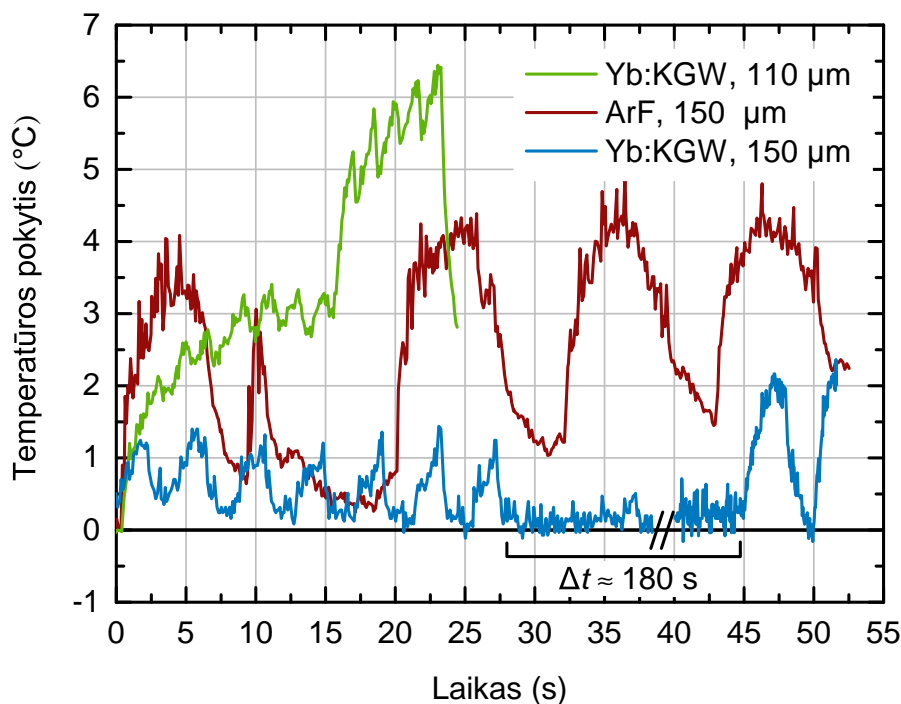
Triušio ragenos abliacijos greitis įvertintas ir kitu būdu. Žinant centrinę abliacijos gylį ir tariant, kad epitelio ir stromos abliacijos greičiai yra vienodi, pagal numatytą TransFRK abliacijos metu pašalinamos ragenos dalies geometrinę formą, galima įvertinti bendrą pašalintą ragenos audinio tūrį. Žinant visą procedūros trukmę, kurios reikėjo šiam tūriui pašalinti,

3. Ragenos abliacija

bei tūrį, kuris atitinka 1 D laužiamosios gebos pokytį tam tikro diametro optinėje zonoje, galima įvertinti abliacijos spartą. Atlikę šiuos skaičiavimus įvertinome, kad viena miopijos korekcijos dioptrijs 6 mm abliacijos zonoje femtosekundiniais UV impulsais suformuojama per $\sim 1,6$ s.

Ragenos kaitimas abliacijos metu. Ragenos paviršiaus temperatūra abliacijos procedūros metu buvo registruojama naudojant IR kamerą. Matuojant temperatūrą buvo laikoma, kad triušio ragenos spinduliavimo geba yra tokia pati kaip *ex vivo* kiaulės ragenos ir lygi 0,96 (įvertinta atskiru matavimu, prieš tai palaikius kiaulės akies obuolį žinomos temperatūros vandens vonelėje ir IR kamera užfiksavus nusausinto ragenos paviršiaus temperatūrą). Triušio ragenos temperatūrų kitimo laike palyginimas skirtingų procedūrų metu pateiktas 3.24 pav. Transepitelinės nestabdomos abliacijos femtosekundiniais impulsais metu maksimalus temperatūros pokytis neviršijo 7°C (žr. 3.24 pav., žalia linija). Tokia temperatūros laikinė priklausomybė yra tiesiogiai susieta su pluošto skenavimo algoritmu. Iš pradžių, šalinant epitelį lazerio pluoštas monotoniškai skenuojamas 6,6 mm skersmens skritulio zonoje, todėl pirmąsias 10 s temperatūra auga, kol centrinėje abliacijos zonos dalyje nusistovi maždaug 3°C aukštesnė nei pradinė temperatūra. Tačiau maždaug po 15 s baigiamas šalinti epitelis ir abliacijos zona sumažinama iki 6 mm skersmens bei pradedamas formuoti lęšis – pluoštas skenuojamas pamainomis tai mažo ($0\text{ mm} < d < 3\text{ mm}$), tai didelio ($3\text{ mm} < d < 6\text{ mm}$) skersmens skritulio zonoje, todėl, lyginant su epitelio šalinimo etapu ($d = 6,6\text{ mm}$), centrinėje abliacijos zonos dalyje padidėja spinduliuotės galios tankis. Dėl to lęšio formavimo metu ragenos centre maksimali temperatūra išauga. Temperatūros pokyčio priklausomybėje nuo laiko, refrakcinio pokyčio formavimo metu (nuo 15 s iki 23 s), matomi penki maksimumai. Jie taip pat susiję su pluošto skenavimo algoritmu. Stengiantis sumažinti lokalų kaitinimą, viename abliacijos sluoksnyje skenavimo eilutės buvo praretintos penkis kartus, o kiekvieną sluoksnį sudarantys penki pasluoksniai papildomai išretinti laike. Todėl visą refrakcinio pokyčio formavimą galima įsivaizduoti kaip vienas po kito abliuojamus penkis lęšiukus, kurie sudaryti iš pavienių pasluoksnų su praretintomis eilutėmis.

Eksimerinės transepitelinės abliacijos metu užregistruota triušio ragenos paviršiaus temperatūros pokyčio laikinė dinamika pavaizduota raudona linija 3.24 pav. Dėl ribotos infraraudonosios kameros vidinės atminties talpos nepavyko įrašyti visos eksimeriniu lazeriu atliktos procedūros, todėl šiame grafike pateikta tik ragenos stromos abliacijos metu užregistruota tempera-



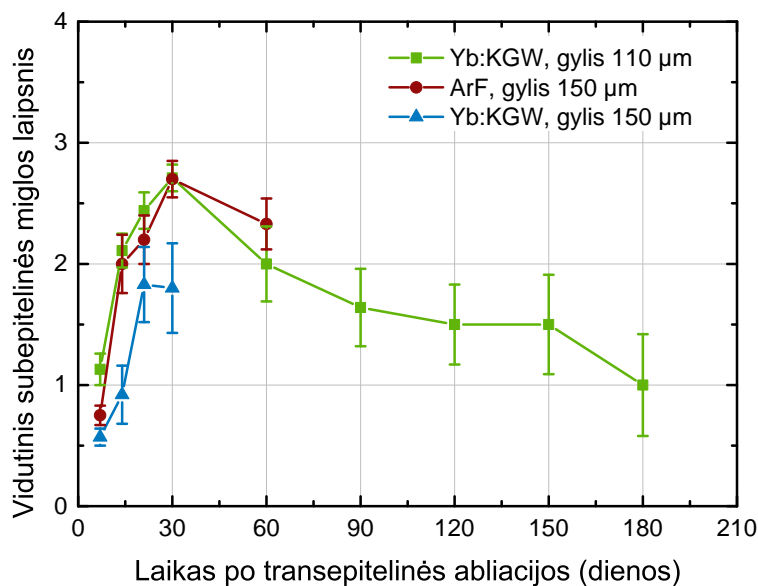
3.24 pav. Skirtingų procedūrų metu užregistruoto maksimalaus ragenos paviršiaus temperatūros pokyčio priklausomybė nuo laiko: nepertraukiamą 110 μm gylio TransFRK femtosekundiniais UV impulsais (žalia linija), 150 μm gylio stromos abliacija ArF eksimerinio lazerio impulsais (raudona linija), femtosekundinė 150 μm gylio TransFRK su įterptomis pauzėmis (mėlyna linija).

tūros pokyčio priklausomybė nuo laiko, kuri iš esmės nesiskiria nuo epitelio abliacijos metu stebimos temperatūros dinamikos. Atliekant transepitelinę abliaciją eksimeriniu ArF lazeriu maksimali ragenos temperatūra neviršijo 5 °C. Dėl gamintojo numatyto operacijos protokolo, procedūra maždaug kas 7 s buvo periodiškai stabdoma įterpiant ne trumpesnes kaip 2 s pauzes.

Į femtosekundinio lazerio abliacijos protokolą įterpus tą patį, minimalią eksimerinio lazerio stabdymo trukmę atitinkantį ($\Delta t = 2\text{ s}$), paūzių skaičių, maksimalus triušio ragenos temperatūros pokytis visos transepitelinės abliacijos metu neviršijo 2,5 °C (3.24 pav., mėlyna linija).

Mūsų tyrimuose naudoto eksimerinio ArF lazerio pluoštas turėjo plokščios viršūnės intensyvumo skirstinį, todėl beveik visame pluošto plote intensyvumas buvo vienodas (didesnis už slenkstinę abliacijos intensyvumo vertę). Femtosekundinio lazerio pluoštas ties abliuojamu paviršiumi turėjo supergausinį intensyvumo skirstinį, todėl periferinėje pluošto dalyje intensyvumas buvo mažesnis už slenkstinį ir dalis impulso energijos virsdavo šiluminiais nuostoliais. Nepaisant to, femtosekundinės abliacijos su pauzėmis metu ragena kaito žymiai mažiau nei abliuojant nanosekundiniais ArF

3. Ragenos abliacija



3.25 pav. Vidutinio subepitelinės miglos laipsnio dinamika triušio ragenoje po skirtingų transepitelinės abliacijos procedūrų: nepertraukiamos 110 μm gylio TransFRK femtosekundiniais UV impulsais (žalia kreivė), transepitelinės 150 μm gylio abliacijos ArF eksimerinio lazerio impulsais (raudona kreivė) ir femtosekundinės 150 μm gylio TransFRK su įterptomis pauzėmis (mėlyna kreivė).

lazerio impulsais.

Subepitelinės miglos vertinimas. Triušių ragenos gijimo eiga buvo vertinama pagal subepitelinės miglos dinamiką po operacijos. Dviejose ragenose po 110 μm gylio TransFRK procedūros femtosekundiniais UV impulsais išsivystė keratitas, todėl šioms ragenoms subepitelinės miglos dinamika nebuvo vertinta.

Subepitelinė migla, kaip ir po FRK procedūros, iš pradžių intensyvėjo, ryškiausiai matėsi praėjus mėnesiui po operacijos, o vėliau ragenos palaipsniui skaidrėjo (3.25 pav.). Silpniausiai drumstėsi ragenos po modifikuotos 150 μm gylio TransFRK procedūros femtosekundiniais impulsais. Lyginant ragenos gijimą po modifikuotos 150 μm gylio TransFRK ir kitų dviejų procedūrų (110 μm gylio TransFRK ir eksimerinio ArF lazerio abliacijos), statistinis Mann–Whitney testas po 14 d. ir 30 d. rodė reikšmingą subepitelinės miglos intensyvumo skirtumą, tačiau dėl mažo triušių skaičiaus šioje grupėje sunku daryti apibendrintas išvadas.

Histologinė analizė. Iš karto po abliacijos paimtų akies obuolių histologinių pjūvių mikroskopinė analizė neparodė jokių esminių stromos paviršiaus lygumo skirtumų tarp eksimeriniu ArF lazeriu bei femtosekundiniais

UV impulsais ($150\ \mu\text{m}$ gylio TransFRK) abliuotų ragenų.

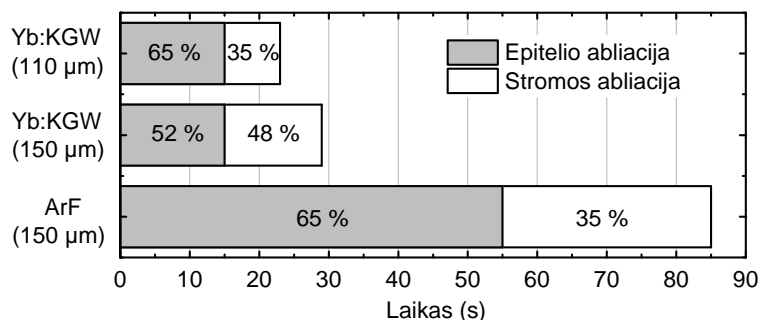
Praėjus mėnesiui po $110\ \mu\text{m}$ gylio TransFRK operacijos, visų histologiniams tyrimams paimtų akių epitelio storis buvo normalus, vietomis buvo pastebėtas sustorėjęs ir nedidelius stromos įdubimus išlyginantis epitelio sluoksnis. Epitelio sustorėjimas po refrakcijos korekcijos yra įprastas reiškinys [173, 174]. Trijose ragenose pastebėta galima pavienių epitelio citų edema. Po eksimerinio ArF lazerio abliacijos ir modifikuotos $150\ \mu\text{m}$ gylio TransFRK procedūros femtosekundiniais impulsais daugumos triušių epitelio sluoksnis buvo šiek tiek plonesnis nei įprastai. Histologiniuose preparatuose stebėtas subepitelinis fibrozės sluoksnis savo storiu ir sandara buvo panašus po visų skirtingų lazerinių procedūrų. Gilesniuose stromos sluoksniuose, Descemeto membranoje bei endotelyje patologinių pakitimų nepastebėta.

3.4 Rezultatų aptarimas

In vivo triušio ragenoje atlikti abliacijos tyrimai parodė, kad FRK ir TransFRK procedūrų metu femtosekundiniais impulsais galima tiksliai ir atkartojamai modifikuoti ragenos paviršių. Abliacijos sparta femtosekundiniais $205\ \text{nm}$ bangos ilgio impulsais $6\ \text{mm}$ optinėje zonoje trumparegystės korekcijos procedūros metu per $\sim 1,6\ \text{s}$ leidžia suformuoti 1 D laužiamosios gebos pokytį, o tai prilygsta šiuolaikinių moderniausių eksimerinių sistemų abliacijos spartai. Kol kas didesnę abliacijos spartą demonstruoja tik dvi komercinės ArF eksimerinės sistemos. „Amaris[®] RS1050“ („Schwind eye-tech-solutions“, Vokietija) 1 D laužiamosios gebos pokytį suformuoja per $1,3\ \text{s}$ [90], o „WaveLight[®] EX500“ („Alcon“, JAV) – per $1,4\ \text{s}$ [175]. Didelė abliacijos sparta refrakcinėje chirurgijoje laikoma privalumu, ypač kai koreguojama didelės refrakcijos ydos arba atliekama transepitelinė abliacija: kuo trumpiau trunka procedūra, tuo mažesnė atsitiktinių akies judesių rizika ir mažesnis ragenos hidratacijos kitimas [91], o kartu ir mažesnė tikimybė, jog prireiks pakartotinės korekcijos. Atliekant LASIK procedūrą, keliasdešimt sekundžių trunkanti abliacija UV impulsais sudaro tik palyginti nedidelę visos procedūros trukmės dalį. Jeigu būtų įmanoma atlikti visą LASIK procedūrą vienu lazeriu, procedūra galėtų sutrumpėti keliomis minutėmis.

Skirtingą vandens kiekį turinčių ragenų abliacijos greitis $193\ \text{nm}$ bangos ilgio spinduliuote nėra pastovus ir tai daro didelę įtaką refrakcijos rezultatams bei ragenos stromos paviršiaus lygumui [155–157, 176]. Natūralų ra-

3. Ragenos abliacija



3.26 pav. TransFRK procedūrų abliacijos trukmių palyginimas neįskaitant pauzių. Procentai žymi, kuri procedūros laiko dalis buvo skirtas epitelio (pilka spalva) ir stromos (balta spalva) abliacijai.

genos hidratacijos lygį gali pakeisti į operuojamą zoną patekę skysčiai, ilga procedūros trukmė ar aplinkos drėgmė [177]. Taip pat yra įrodyta, kad natūralus ragenos hidratacijos laipsnis priklauso nuo žmogaus amžiaus [178]. Kietakūnės femtosekundinės Yb:KGW lazerinės sistemos penktosios harmonikos spinduliuotės 205 nm bangos ilgis skysčiuose sugeriamas silpniau nei trumpesnis eksimerinio lazerio 193 nm bangos ilgis [179]. Todėl abliacijos greitis turėtų mažiau priklausyti nuo vandens kiekio ragenoje ir galima tikėtis tikslesnių refrakcijos korekcijos rezultatų po operacijos. Femtosekundiniais impulsais atlikta triušio ragenos abliacija iki perforacijos taip pat neparodė jokio abliacijos greičio kitimo skirtinguose ragenos stromos sluoksniuose. Tai, kad femtosekundiniai impulsai silpnai sugeriami skystyje patvirtino ir mūsų stebėjimai ištinusiose *ex vivo* kiaulių ragenose – abliuojant drėgną ragenos paviršių vandens sluoksnis nedingsta, bet ragenos storis pastebimai mažėja. Po abliacijos femtosekundiniais impulsais *in vivo* triušio ragena taip pat neatrodė išdžiūvusi ir, net po 150 μm gylio TransFRK procedūros su pauzėmis, ragenos storį visada pavykdavo išmatuoti papildomai nedrėkinant ragenos paviršiaus. Po transepitelinės abliacijos eksimerinio ArF lazerio impulsais, išmatuoti ragenos storio, papildomai nesudrėkinus ragenos paviršiaus, mums nepavyko.

Visų procedūrų epitelio ir stromos abliacijos trukmių (neįskaitant pauzių) grafinis palyginimas pateikiamas 3.26 pav. Vertinant pagal tai, kiek procentų abliacijos laiko buvo skirta epitelio šalinimui ir kiek ragenos stromos modifikavimui, 110 μm gylio TransFRK abliacija femtosekundiniais impulsais nesiskyrė nuo abliacijos eksimeriniu ArF lazeriu: 65 % procedūros laiko buvo šalinamas epitelis, o likusius 35 % – ragenos stroma. Ir nors epitelio šalinimo etapo pabaiga abiemis procedūroms buvo nustatoma vienodu būdu (pagal epitelio liuminescencijos intensyvumo sumažėjimą), tačiau pachimetru įvertintas centrinis abliacijos gylis smarkiai skyrėsi.

Modifikavus femtosekundinę TransFRK procedūrą abliacijos gylis buvo parinktas taip, kad atitiktų eksimeriniu ArF lazeriu atliktų transepitelinį procedūrų gylį. Geras abliacijos gylio atsikartojimas gautas ne tik iš karto po procedūros, bet ir praėjus savaitei po operacijos, kai ataugo ragenos epitelis. Kaip matyti iš 3.26 pav., 150 μm gylio transepitelinė abliacija femtosekundiniais impulsais truko 2,8 karto trumpiau nei tokio pat gylio abliacija nanosekundiniais ArF lazerio impulsais. Atsižvelgiant į tai ir į ragenos stromos paviršiaus temperatūras abiejų procedūrų metu (žr. 3.24 pav.), išryškėja akivaizdus femtosekundinių impulsų pranašumas – femtosekundinės abliacijos metu per 2,8 karto trumpesnę laiką pašalinus panašų stromos audinio tūrį, maksimali ragenos paviršiaus temperatūra išlieka du kartus mažesnė nei atliekant analogišką abliacijos procedūrą nanosekundiniais ArF lazerio impulsais. Ši femtosekundinių impulsų savybė (žymiai mažesnis šiluminis poveikis gretimoms spinduliuote veikiamoms medžiagos zonoms nei veikiant pikosekundiniais ar ilgesniais impulsais) yra gerai žinoma bei plačiai taikoma lazeriniame medžiagų mikroapdirbime [103, 180].

Triušių ragenos gijimo tendencijos po abliacijos femtosekundiniais 205 nm ir nanosekundiniais 193 nm bangos ilgio impulsais, vertinant subepitelinės miglos dinamiką, buvo panašios. Visą subepitelinės miglos stebėjimo laikotarpį triušių ragenos po gilios 150 μm TransFRK abliacijos femtosekundiniais impulsais su įterptomis pauzėmis atrodė skaidriausios. Mažiausia ragenos subepitelinė drumstis po šios procedūros gali būti siejama su žemiausia ragenos paviršiaus temperatūra abliacijos metu, tačiau dėl mažo triušių skaičiaus šioje grupėje, sunku daryti griežtas išvadas. Tam, kad būtų patvirtinta mūsų hipotezė, būtina atlikti išsamesnius tyrimus.

4 skyrius

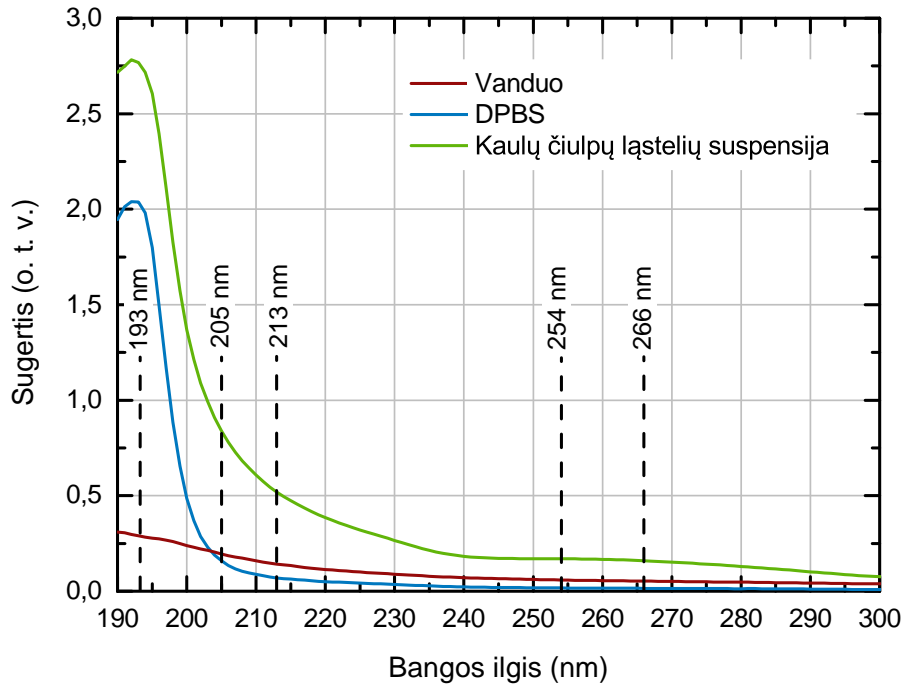
UV spinduliuotės citotoksinis ir genotoksinis poveikis

Prieš pradėdant klinikinius femtosekundinės UV spinduliuotės taikymo refrakcinių ydų korekcijai tyrimus, būtina atsakyti dar į vieną labai svarbų klausimą – ar femtosekundinė 205 nm spinduliuotė, kurios intensyvumas keliomis eilėmis viršija nanosekundinio eksimerinio ArF lazerio spinduliuotės intensyvumą, nesukelia biologiniuose audiniuose nepageidaujamo mutageninio poveikio. Norėdami įvertinti, kaip skirtingų impulso trukmių ir skirtingų bangos ilgių spinduliuotės veikia ląstelės DNR, tyrėme UV spinduliuotės citotoksinį ir genotoksinį poveikį pelių kaulų čiulpų ir odos epitelio ląstelėms.

4.1 Tyrimo metodai

Eksperimentai su gyvūnais buvo atliekami gavus leidimą iš Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos. Gyvūnai gauti iš Vilniaus universiteto Imunologijos instituto. Eksperimentams naudoti BALB/c albinosų genties pelių patinėliai. UV spinduliuotės citotoksinis ir genotoksinis poveikis buvo tiriamas apšvitinus pelių ląstelių ir Dulbecco fosfato buferinio tirpalo (DPBS) suspensijas.

Pelių kaulų čiulpų ląstelės tyrimams buvo pasirinktos dėl palyginti nesudėtingo šių ląstelių išskyrimo būdo bei didelio jautrumo išoriniam poveikiui. *In vitro* išaugintas pelių odos epitelio ląstelių kultūras tyrimams pasirinkome dėl kelių priežasčių. Natūraliomis sąlygomis odos epitelio ląstelės, kitaip nei kaulų čiulpų ląstelės, yra nuolatos veikiamos saulės spektro UV spinduliuote. Todėl į UV spinduliuotės poveikį šios ląstelės turėtų reaguoti panašiai kaip gyvų organizmų odos bei ragenos epitelio ląstelės. Odos epitelio ląstelės savo sandara ir dydžiu labiau panašios į ragenos epitelio ląsteles, jos yra



4.1 pav. Vandens, DPBS tirpalo ir kaulų čiulpų ląstelių sugerties spektrai.

gerokai didesnės už kaulų čiulpų ląsteles. Vidutinis pelių odos epitelio ląstelės skersmuo yra $(35,9 \pm 2,0) \mu\text{m}$, tuo tarpu kaulų čiulpų ląstelės skersmuo daugiau kaip keturis kartus mažesnis – $(7,6 \pm 0,2) \mu\text{m}$.

Tam, kad įvertintume, kuri skirtingo bangos ilgio spinduliuotės dalis sugerama buferiniame tirpale ir kaulų čiulpų ląstelių suspensijoje, spektrofotometru „UV-310PC“ („Shimadzu“, Japonija) išmatavome ląstelių suspensijos, DPBS ir vandens sugerties spektrus. Iš 4.1 pav. pateiktų spektrų matyti, kodėl, naudodami ląstelių suspensijos švitinimo metodą, negalėtume tiesiogiai palyginti eksimerinio ArF lazerio ir penktosios femtosekundinio Yb:KGW lazerio harmonikos spinduliuočių poveikio. Buferinio tirpalo, kuriame buvo laikomos ląstelės, sugertis ties 193 nm yra keliasdešimt kartų didesnė nei ties 205 nm. Visa eksimerinio lazerio spinduliuotė sugerama ploname paviršiniame suspensijos sluoksnyje ir didžioji ląstelių dalis lieka nepaveiktos. Todėl, norint teisingai palyginti 193 nm ir 205 nm spinduliuočių poveikį, reikėtų naudoti kitokius metodus, pavyzdžiui, švitinti ne ląstelių suspensiją, bet ląstelių kolonijas, užaugintas ant UV šviesai skaidraus padėklo.

Norėdami ištirti, ar femtosekundiniai 205 nm impulsai dėl didelio intensyvumo (trumpos impulso trukmės) nesukelia didesnio genotoksinio poveikio, palyginimui mes pasirinkome artimo bangos ilgio 213 nm nanosekundinę spinduliuotę. Šio bangos ilgio šaltinis pasirinktas dar ir dėl to, kad 210–213 nm bangos ilgio nanosekundiniai impulsai sėkmingai taikomi ragenos

4. UV spinduliuotės poveikis ląstelėms

stomos abliacijai [30,31,34,94]. Tyrimais įrodyta, kad 213 nm spinduliuotės genotoksinis poveikis ląstelėms yra nedidelis ir artimas 193 nm ArF lazerio spinduliuotės genotoksiniam poveikiui [37]. Taip pat yra žinoma, kad 193 nm ar 213 nm bangos ilgio spinduliuotė sukelia žymiai mažesnę genotoksinį poveikį nei 254 nm ar 266 nm UV spinduliuotė [37,38,181]. Stipresnis didesnio bangos ilgio UV spinduliuotės genotoksinis poveikis yra siejamas su didele DNR sugertimi ties 260 nm. Kad galėtume palyginti mažesnių (205 nm ir 213 nm) ir didesnių (~ 260 nm) bangos ilgių spinduliuočių poveikį, ląsteles švitinome iš viso penkiais skirtingais šviesos šaltiniais. Trys ilgesnių bangų spinduliuotės šaltiniai buvo naudojami norint palyginti, ar didelio intensyvumo femtosekundiniai 257 nm ir nanosekundiniai 266 nm impulsai nepasižymi didesniu genotoksinio poveikiu nei nuolatinė 254 nm lempos spinduliuotė. Ląstelių suspensijų švitinimui naudojome šiuos šviesos šaltinius: femtosekundinio Yb:KGW lazerio ketvirtosios (257 nm) ir penktosios (205 nm) harmonikos impulsus, nanosekundinio Nd:YAG lazerio „NL301“ (UAB „Ekspla“, Lietuva) ketvirtosios (266 nm) ir penktosios (213 nm) harmonikos impulsus bei gyvsidabrio lempos („Carl Roth“, Vokietija) 254 nm bangos ilgio nuolatinę spinduliuotę.

UV spinduliuotės genotoksinio poveikio vertinimui naudojome kometos (pavienių ląstelių elektroforezės gelyje) metodą [182]. Kometų analizė bei ląstelių paruošimo procedūra išsamiai aprašyta mūsų straipsnyje [183]. Tam, kad būtų nustatytos kometos metodo veikimo ribos, visada lygiagrečiai buvo atliekamas ir ląstelių gyvybingumo vertinimas. Kai apšvitintų ląstelių gyvybingumas didelis, t. y. artimas kontrolinės nešvitintų ląstelių grupės gyvybingumui, galima teigti, kad DNR pažaidos atsiranda vien tik dėl genotoksinio spinduliuotės poveikio. Tuo tarpu, jeigu spinduliuotė greta genotoksinio pasižymi ir citotoksinio poveikiu, gaunami nebevienareikšmiai kometų analizės rezultatai, nes stebimos visos, ir dėl genotoksinio, ir dėl citotoksinio poveikio atsiradusios, DNR pažaidos. Kai dėl citotoksinio spinduliuotės poveikio ląstelių gyvybingumas sumažėja daugiau kaip 25 %, kometų analizės rezultatai pasidaro nebepatikimi. Būtent todėl DNR pažaidų tyrimui kometos metodu apšvitosis dozės turi būti parenkamos atsižvelgiant į citotoksinį spinduliuotės poveikį. Prieš atlikdami genotoksinio UV spinduliuotės poveikio tyrimus, apšvitosis dozes parinkome taip, kad jos perklotų visą kometos metodo veikimo diapazoną: mažiausia apšvitosis dozė buvo parenkama taip, kad genotoksinis spinduliuotės poveikis būtų dar nežymus (nesiskirtų nuo kontrolinio nešvitintose ląstelėse aptinkamų DNR pažaidų kiekio), o didžiausios – atsižvelgiant į citotoksinį spinduliuotės poveikį.

4.1 lentelė Pelių kaulų čiulpų ląstelių suspensijos švitinimui naudotų UV spinduliuotės šaltinių parametrai.

	205 nm	213 nm	266 nm	254 nm
Impulso trukmė	~ 500 fs	6 ns	6 ns	-
Dažnis	20 kHz	10 Hz	10 Hz	-
Impulso energijos tankis	$35 \frac{\mu\text{J}}{\text{cm}^2}$	$35 \frac{\mu\text{J}}{\text{cm}^2}$	$35 \frac{\mu\text{J}}{\text{cm}^2}$	-
Impulso energija	$1,35 \mu\text{J}$	~ 100 μJ	~ 100 μJ	-
Pluošto skersmuo ties $1/e^2$ maksimalaus intensyvumo verte	2,2 mm	~ 25 mm	~ 25 mm	-
Vidutinis spinduliuotės galios tankis	$3,5 \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}$	$0,35 \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}$	$0,35 \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}$	$0,35 \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}$

Dėl ribotų mūsų turimos įrangos techninių galimybių, vienu metu genotoksiškumo vertinimui galėjome apdoroti ne daugiau kaip 20 ląstelių mėginių, įskaitant kontrolinį nešvitintų ląstelių mėginį. Dėl šios priežasties, genotoksiškumo tyrimui turėjome rasti kompromisą tarp švitinimui naudojamų spinduliuotės šaltinių skaičiaus ir apšvitės dozių skaičiaus. Pelių kaulų čiulpų ląstelių švitinimui pasirinkome keturis (205 nm, 213 nm, 266 nm ir 254 nm), o odos epitelio ląstelių – tris (205 nm, 257 nm ir 254 nm) UV spinduliuotės šaltinius.

Pelių kaulų čiulpų ląstelių švitinimui naudotų UV spinduliuotės šaltinių parametrai pateikiami 4.1 lentelėje.

Tiriant UV spinduliuotės poveikį pelių kaulų čiulpų ląstelėms iš viso buvo apšvitintos dešimtys pelių kaulų čiulpų ląstelių suspensijos. 60 μl ląstelių suspensijos buvo paskleidžiama ~ 1 cm^2 plote, apšvitinama ir padalinama į dvi dalis: 20 μl – ląstelių gyvybingumo įvertinimui tripano mėlio testu [184], o likusi 40 μl – DNR pažaidų įvertinimui kometos metodu. Vienos pelės kaulų čiulpų suspensija buvo švitinama keturiais UV spinduliuotės šaltiniais, po šešias skirtingas apšvitės dozes: 1) 0,35 mJ/cm^2 , 2) 1,75 mJ/cm^2 , 3) 3,5 mJ/cm^2 , 4) 17,5 mJ/cm^2 , 5) ir 6) 105 mJ/cm^2 . Dėl riboto vienu metu apdorojamų mėginių skaičiaus, genotoksinis poveikis buvo vertinamas tik keturioms mažiausioms apšvitės dozėms. Visų impulsinių lazerinių spinduliuočių (205 nm, 213 nm ir 266 nm) parametrai buvo parenkami taip, kad impulso energijos tankis ties švitinamu bandiniu būtų vienodas ir lygus 35 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$. Nd:YAG lazerio impulsų pasikartojimo dažnis buvo 2000 kartų mažesnis nei Yb:KGW lazerio, todėl, norint išlaikyti vienodą impulso

4. UV spinduliuotės poveikis ląstelėms

energijos tankį ir tolygiai apšviesti $\sim 1 \text{ cm}^2$ plote paskleistą ląstelių suspensijos lašą, teko naudoti skirtingas švitinimo technikas. Didelio impulsų pasikartojimo dažnio ir mažo skersmens femtosekundinis 205 nm bangos ilgio pluoštas buvo tolygiai skenuojamas didesniame nei suspensijos lašas plote, naudojant galvanometrinių veidrodėlių skenerį „hurrySCAN10“ („Scanlab“, Vokietija). Tuo tarpu nanosekundinė mažo impulsų pasikartojimo dažnio 213 nm ir 266 nm spinduliuotė buvo išplečiama singletiniu lęšiu, o bandinys apšvitinamas tik centrine išplėsto pluošto dalimi, kur spinduliuotės intensyvumas yra beveik vienodas.

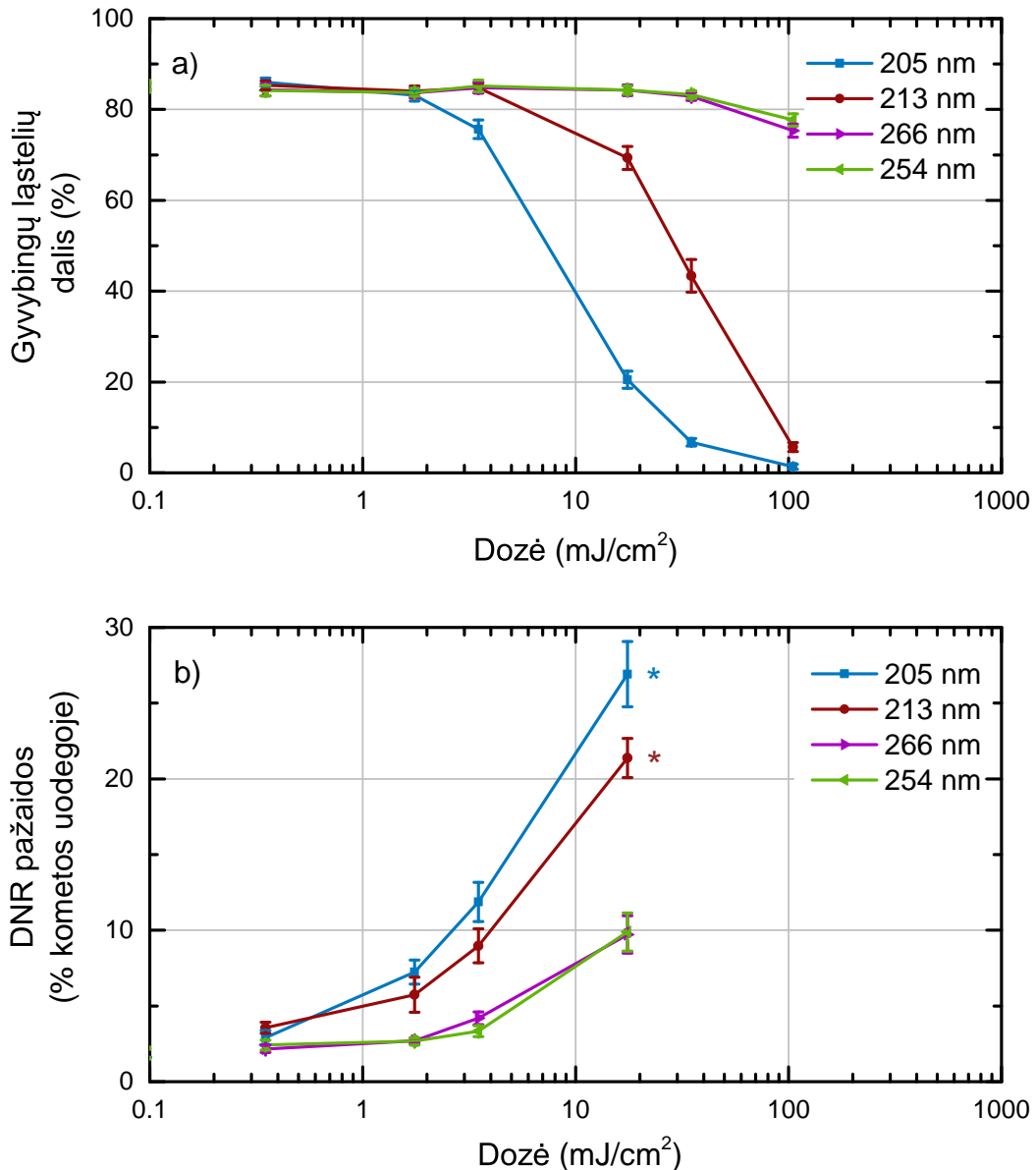
Tiriant UV spinduliuotės poveikį pelių odos epitelio ląstelėms, švitinimo eksperimentai buvo kartojami iš viso penkis kartus. Jų metu femtosekundinis lazeris veikė 50 kHz impulsų pasikartojimo dažniu. Penktosios harmonikos spinduliuotė (205 nm), kaip ir eksperimentuose su kaulų čiulpų ląstelėmis, buvo tolygiai skenuojama galvanometriniiais veidrodžiais. Ketvirtosios harmonikos (257 nm) pluoštas buvo išplečiamas lęšiu iki $\sim 3 \text{ cm}$ skersmens, o švitinimui naudojama tik centrinė pluošto dalis. 257 nm ir 205 nm spinduliuotės vidutinis galios tankis visų eksperimentų metu buvo $1,4 \text{ mW/cm}^2$, gyvsidabrio lempos galios tankis kito $0,8\text{--}0,9 \text{ mW/cm}^2$ ribose, tačiau kiekvieną kartą skaičiuojant švitinimo trukmę į tai buvo atsižvelgiama.

Vidutinės spinduliuotės galios matavimas buvo atliekamas galios matuoklio „Nova II“ šiluminį galios jutiklį „3A“ („Ophir Optronics“, Izraelis) pastačius į švitinamos zonos centrą, švitinimo plokštumoje. Visais atvejais apšvitinamas plotas buvo didesnis nei galios matuoklio jutiklio plotas ($0,7 \text{ cm}^2$), todėl norint įvertinti galios tankį, išmatuota galia buvo dalinama iš jutiklio ploto. Švitinant skirtingomis dozėmis, buvo keičiama tik švitinimo trukmė.

4.2 UV spinduliuotės poveikis pelių kaulų čiulpų ir odos epitelio ląstelėms

4.2 pav. pateikti suvidurkinti dešimties pelių kaulų čiulpų ląstelių švitinimo rezultatai. Viršutiniame grafike (4.2 pav., a) pateikta, kaip nuo švitinimo dozės priklauso gyvybingų ląstelių (su nepažeista membrana) dalis, apšvietus skirtingais UV spinduliuotės šaltiniais. Iš jo matyti, kad iš visų mūsų tirtų spinduliuočių, 205 nm femtosekundinė spinduliuotė pasižymi stipriausiu citotoksiniu poveikiu, t. y. esant vienodai apšvitosis dozei nužudo daugiausiai ląstelių. Nors teiginys, kad „femtosekundinė spinduliuotė nužu-

4.2. UV spinduliuotės poveikis pelių kaulų čiulpu ir odos epitelio ląstelėms



4.2 pav. Pelių kaulų čiulpu ląstelių a) gyvybingumo bei b) DNR pažeidimų kiekio priklausomybė nuo apšvitės dozės, esant skirtingiems (205 nm, 213 nm, 266 nm ir 254 nm bangos ilgio) UV spinduliuotės šaltiniams. Žvaigždutėmis pažymėta kometos metodu aptiktos DNR pažeidimos, kurias sukėlė ne tik genotoksinis, bet ir citotoksinis 205 nm spinduliuotės poveikis.

do daugiausiai ląstelių“ skamba bauginančiai, tačiau mūsų tiriamu atveju „mirusi ląstelė – gera ląstelė“, nes jos DNR daugiau nebesireplikuos. Didžiausias pavojus kyla, kai ląstelė lieka gyva, bet jos DNR yra pažeista. Tada išlieka tikimybė, kad DNR trūkiausiai bus netinkamai atstatyti ir tos mutacijos bus perduodamos ląstelės dalijimosi metu.

Taip pat iš 4.2 pav., a dalies, galima pastebėti, kad citotoksinis poveikis labiau priklauso nuo bangos ilgio nei nuo impulso trukmės. 205 nm femtosekundiniai ir 213 nm nanosekundiniai impulsai kaulų čiulpu ląsteles

4. UV spinduliuotės poveikis ląstelėms

žudo žymiai smarkiau nei 266 nm nanosekundiniai impulsai arba nuolatinė gyvsidabrio lempos 254 nm spinduliuotė. Atlikę dviejų nepriklausomų imčių vidurkių analizę pagal Stjudento testą, neradome statistinio skirtumo tarp nuolatinės 254 nm ir nanosekundinės 266 nm spinduliuotės poveikių ląstelių gyvybingumui ($p < 0,05$).

Kaip matyti iš 4.2 pav., b grafiko, esant vienodoms apšvitos dozėms stipriausiu genotoksinio poveikiu pasižymėjo 205 nm ir 213 nm spinduliuotės. Kai ląstelių gyvybingumas sumažėja $\sim 25\%$ ir daugiau, žymus citotoksinis spinduliuotės poveikis iškraipo kometų analizės rezultatus ir jie nebėra patikimi. Šios DNR pažeidimų kiekio vertės 4.2 pav., b dalyje pažymėtos žvaigždutėmis. 205 nm spinduliuotės citotoksinis poveikis esant $3,5 \text{ J/cm}^2$ apšvitos dozei buvo reikšmingai pakitęs ($75,6 \pm 2,0\%$), palyginti su kontrolinės nešvitintų ląstelių grupės gyvybingumu ($85,1 \pm 0,3\%$), todėl šiai dozei kometų analizės rezultatai taip pat galėjo būti iškraipyti.

Kaip minėjome, tikimybė ląstelei mutuoti priklauso tiek nuo citotoksinio, tiek nuo genotoksinio spinduliuotės poveikio. Saugiausia spinduliuotė šiuo požiūriu yra ta, kuri nužudo ląsteles nepaveikdama ląstelės DNR, o pavojingiausia – ta, kuri nedaro poveikio ląstelės gyvybingumui, bet inicijuoja DNR trūkius. Todėl naudingiau yra įvertinti ne kaip genotoksinis spinduliuočių poveikis priklauso nuo dozės, bet palyginti skirtingų spinduliuotės šaltinių genotoksinį poveikį esant tam pačiam ląstelių gyvybingumui. Įvertinus UV spinduliuočių poveikį ląstelių gyvybingumui, kiekvienam spinduliuotės šaltiniui buvo nustatytos apšvitos dozių ribos, kuriose ląstelių gyvybingumas, palyginti su kontroliniu nešvitintų ląstelių gyvybingumu, reikšmingai nepakinta. Šiuo atveju kometų analizės rezultatai atspindi vien tik genotoksinį spinduliuotės poveikį, kuris kartu yra proporcingas ląstelės mutavimo tikimybei. Išmatuotas nešvitintų ląstelių gyvybingumas buvo ($85,1 \pm 0,3\%$), todėl laikėme, kad, esant ląstelių gyvybingumui didesniai nei 80% , DNR pažeidimai yra sukeltos tik dėl genotoksinio UV spinduliuotės poveikio. 4.2 lentelėje pateikiamos skirtingais UV spinduliuotės šaltiniais sukulto genotoksinio poveikio kaulų čiulpų ląstelėms palyginimas, esant didžiausiai apšvitos dozei, kuria paveiktų ląstelių gyvybingumas išlieka didesnis nei 80% . Vertinant šiuo būdu, kai ląstelių gyvybingumas apšvitinus skirtingais spinduliuotės šaltiniais yra panašus, 205 nm spinduliuotė sukelia šiek tiek mažiau DNR pažeidimų ($7,24 \pm 0,8\%$) nei kiti švitinimo šaltiniai (nuo $(9,0 \pm 1,1)\%$ iki $(9,9 \pm 1,3)\%$).

Atsižvelgdami į pateiktus rezultatus pastebėsime, kad nors 205 nm spinduliuotės intensyvumas buvo penkiomis eilėmis didesnis, genotoksinis po-

4.2. UV spinduliuotės poveikis pelių kaulų čiulpų ir odos epitelio ląstelėms

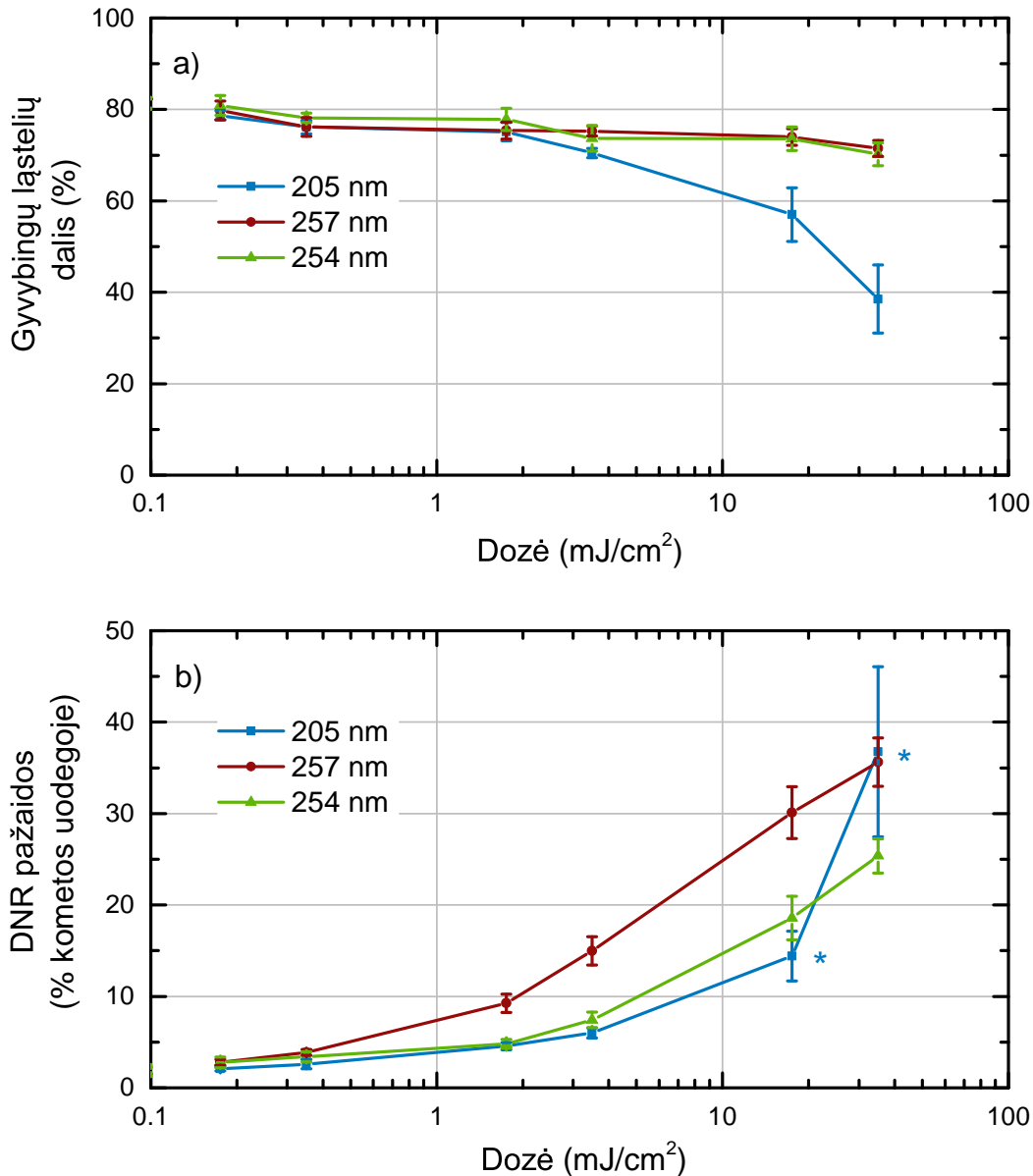
4.2 lentelė Skirtingais UV spinduliuotės šaltiniais sukkelto genotoksinio poveikio kaulų čiulpų ląstelėms palyginimas, esant didžiausiai apšvitęs dozei, kuria paveiktų ląstelių gyvybingumas išlieka didesnis nei 80 %.

$\lambda(\text{nm})$	Dozė (mJ/cm^2)	Gyvybingumas (%)	DNR pažaidos (% kometos uodegoje)
205	1,75	$83,1 \pm 1,2$	$7,2 \pm 0,8$
213	3,5	$84,8 \pm 1,0$	$9,0 \pm 1,1$
266	17,5	$84,3 \pm 1,2$	$9,7 \pm 1,2$
254	17,5	$84,3 \pm 0,9$	$9,9 \pm 1,3$

veikis kaulų čiulpų ląstelėms buvo palyginamas su 213 nm spinduliuotės poveikiu. Kadangi 213 nm spinduliuotė laikoma nepavojinga ir yra taikoma ragenos stromos abliacijos procedūroms, mūsų gauti rezultatai leidžia teigti, kad 205 nm spinduliuotė taip pat gali būti saugiai taikoma analogiškomis procedūroms. Neaišku, ar dėl skirtingo ląstelių suspensijos pralaidumo skirtingiems bangos ilgiams, ar dėl mažo kaulų čiulpų ląstelių dydžio, ar dėl pačio ląstelių tipo, mūsų gauti genotoksinio poveikio rezultatai, kitaip negu literatūroje pateikiami duomenys [37, 38], neparodė stipresnio ilgesnių bangų (254 nm ir 266 nm) genotoksinio poveikio.

Pelių odos ląstelių gyvybingumo ir DNR pažaidų vidutinės vertės esant skirtingoms apšvitęs dozėms pateiktos 4.3 pav. Kaip matyti iš 4.3 pav., a dalies, taip pat kaip ir kaulų čiulpų ląstelėms, odos epitelio ląstelėms didžiausią citotoksinį poveikį darė femtosekundiniai 205 nm impulsai. Dar kartą buvo patvirtinta hipotezė, kad citotoksinis poveikis stipriai priklauso nuo bangos ilgio, bet ne nuo impulso trukmės – femtosekundinių 257 nm bangos ilgio impulsai ląstelių gyvybingumą veikė taip pat kaip ir nuolatinė 254 nm bangos ilgio spinduliuotė. Tačiau genotoksinis poveikis femtosekundinių 257 nm impulsų atveju buvo didesnis nei nuolatinės 254 nm lempos spinduliuotės (žr. 4.3 pav., b dalis, raudona ir žalia kreivės). Tam įtakos galėjo turėti didelis 257 nm impulsų spinduliuotės intensyvumas (trumpa ~ 350 fs impulso trukmė). Mažiausiu genotoksinio poveikiu pasižymėjo 205 nm femtosekundiniai impulsai (4.3 pav., b, mėlyna kreivė). DNR fragmentų kometos uodegoje skaičius smarkiai išaugo tik dviems didžiausioms 205 nm spinduliuotės dozėms, kurioms esant ląstelių gyvybingumas buvo gerokai mažesnis (atitinkamai $(57,0 \pm 5,9)$ % ir $(38,5 \pm 7,4)$ %) nei kontrolinės nešvitintų ląstelių grupės $(81,3 \pm 1,0)$ %. Tai reiškia, kad 205 nm spinduliuote apšvitintų ląstelių kometų analizės rezultatams, esant $17,5 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ ir

4. UV spinduliuotės poveikis ląstelėms



4.3 pav. Pelių odos epitelio ląstelių a) gyvybingumo bei b) DNR pažeidimų kiekio priklausomybė nuo apšvitės dozės esant skirtingiems (205 nm, 257 nm ir 254 nm bangos ilgio) UV spinduliuotės šaltiniams. Žvaigždutėmis pažymėta kometos metodu aptiktos DNR pažeidimas, kurias sukėlė ne tik genotoksinis, bet ir citotoksinis 205 nm spinduliuotės poveikis.

35 mJ/cm² dozėmis, turėjo įtakos spinduliuotės citotoksiškumas (šie taškai 4.3 pav., b grafike pažymėti žvaigždutėmis).

Tripano mėlio testu įvertintas nešvitintų odos epitelio ląstelių gyvybingumas buvo (81,3 ± 1,0) %. Atsižvelgdami į tai, lyginome genotoksinį spinduliuočių poveikį esant didžiausiai apšvitės dozei, kuria paveiktų ląstelių gyvybingumas išlieka didesnis nei 70 %. Analizės rezultatai pateikiami 4.3 lentelėje. Iš šios lentelės matyti, kad esant ~ 74 % ląstelių gyvybingumui femtosekundinių 205 nm impulsų poveikis DNR yra beveik keturis kartus mažesnis

4.3 lentelė Skirtingais UV spinduliuotės šaltiniais sukkelto genotoksinio poveikio odos epitelio ląstelėms palyginimas, esant didžiausiai apšvitos dozei, kuria paveiktų ląstelių gyvybingumas išlieka didesnis nei 70 %.

$\lambda(\text{nm})$	Dozė (mJ/cm^2)	Gyvybingumas (%)	DNR pažaidos (% kometos uodegoje)
205	1,75	$75,2 \pm 2,0$	$4,6 \pm 0,4$
257	17,5	$74,0 \pm 1,8$	$30,1 \pm 2,8$
254	17,5	$73,6 \pm 2,6$	$18,6 \pm 2,4$

nei 254 nm nuolatinės spinduliuotės bei daugiau kaip šešis kartus mažesnis nei femtosekundinės 257 nm spinduliuotės.

4.3 Rezultatų aptarimas

Iš visų mūsų tirtų UV spinduliuotės šaltinių femtosekundiniai 205 nm impulsai pasižymi stipriausiu citotoksinu bei, esant dideliame ląstelių gyvybingumui, mažiausiu genotoksinu poveikiu. Todėl galima daryti išvadą, kad 205 nm femtosekundiniais impulsais paveiktų ląstelių genų mutacijų tikimybė yra itin maža. Mūsų rezultatai parodė, kad esant tokioms pačioms apšvitos dozėms didesnio bangos ilgio (257 nm ir 254 nm) spinduliuotė labiau pažeidžia odos epitelio ląstelių DNR nei mažesnio (205 nm). Tai patvirtina ir kitų mokslininkų tyrimų rezultatai, atlikti su triušių [37, 185] ir kiaulių [186] ragenos epitelio ląstelėmis. Skirtingas trumpų (205 nm ir 213 nm) ir ilgų (254 nm, 257 nm, 266 nm) UV bangų poveikis skirtingo tipo ląstelėms gali būti siejamas su ląstelės dydžiu [181]. Kadangi biologiniuose audiniuose UV spinduliuotės sugertis didėja mažėjant bangos ilgiui, trumpesnio bangos ilgio spinduliuotė sugerama mažesniame gylyje. Kai ląstelė didelė (pvz., epitelio ląstelė), o branduolys yra ląstelės centre, didžioji trumpo bangos ilgio UV spinduliuotės dalis sugerama dar nepasiekus ląstelės branduolio, todėl didėja tikimybė, kad ląstelės išorinė membrana ar gyvybiškai svarbios organelės bus suardytos ir ląstelė žus. Tuo tarpu ląstelės branduolyje esanti DNR yra ekranuojama nuo trumpų bangų. Todėl mažėja tikimybė, kad ląstelė su pažeista DNR, išgyvens, netinkamai susiremontuos DNR trūkius (t. y. mutuos), bei savo pakitusią DNR dalijimosi metu perduos naujoms ląstelėms. Ilgesnių UV bangų atveju, ląstelės membranoje ir citoplazmoje sugerama palyginti nedidelė spinduliuotės dalis, todėl didėja tikimybė, kad spinduliuotė pasieks ląstelės branduolį ir bus indukuoti DNR grandinės trūkiai. Kai ląstelė yra maža (kaip kaulų čiulpų), ilgesnio ban-

4. UV spinduliuotės poveikis ląstelėms

gos ilgio UV spinduliuotės sugerties tikimybė iš esmės nepasikeičia. Tačiau trumpoms bangoms ši tikimybė gerokai išauga – dėl kelis kartus trumpesnio atstumo iki ląstelės branduolio didesnė kritusios spinduliuotės dalis sugeba prasiskverbti iki DNR ir indukuoti trūkius.

Mūsų atliktų tyrimų rezultatai parodė, kad citotoksinis ir genotoksinis spinduliuotės poveikis labiausiai priklauso nuo bangos ilgio, o ne nuo impulso trukmės. Esant vienodoms apšvitės dozėms, 205 nm femtosekundinė ir 213 nm nanosekundinė spinduliuotės pasižymi stipresniu citotoksiniu poveikiu nei 254 nm nuolatinė, 266 nm nanosekundinė ar 257 nm femtosekundinė spinduliuotės. Reikia paminėti, kad mūsų atlikti tyrimai vertino DNR pažeidimų kiekį, tačiau mutageniškumo tyrimams būtų pravartu įvertinti apšvitintų ląstelių su pažeista DNR gebėjimą atstatyti DNR grandinės trūkius ir daugintis. Ypač svarbu įvertinti, kokia dalis DNR trūkių atstatoma ne taip, kaip derėtų (šis procesas vadinamas neprogramuota DNR sinteze). Todėl ateityje mutageniškumo tyrimus žadame tęsti naudodami kitus metodus, kurie leistų tiksliau įvertinti femtosekundinių UV impulsų keliamus pavojus.

5 skyrius

Femtosekundinių aIR impulsų taikymas refrakcinėje regos chirurgijoje

Femtosekundiniai aIR impulsai refrakcinėje chirurgijoje taikomi ragenos lopo formavimui bei tūrinių darinių ragenos stromoje sukūrimui. Šias procedūras atkartojančius eksperimentus atlikome naudodami tą pačią femtosekundinę Yb:KGW lazerinę sistemą, kaip ir ankstesniuose ragenos stromos abliacijos tyrimuose. Eksperimentams buvo naudojama fundamentinė lazerio spinduliuotė (1026 nm). Šiame skyriuje aptariami du ragenos lopo formavimo būdai, paremti skirtingais pluošto skenavimo metodais: naudojant f-theta objektyvą (5.1 skyrius) ir skenuojant didelės skaitinės apertūros lęšį (5.2 skyrius). Eksperimentai buvo atlikti tiek *ex vivo*, tiek *in vivo* ragenose.

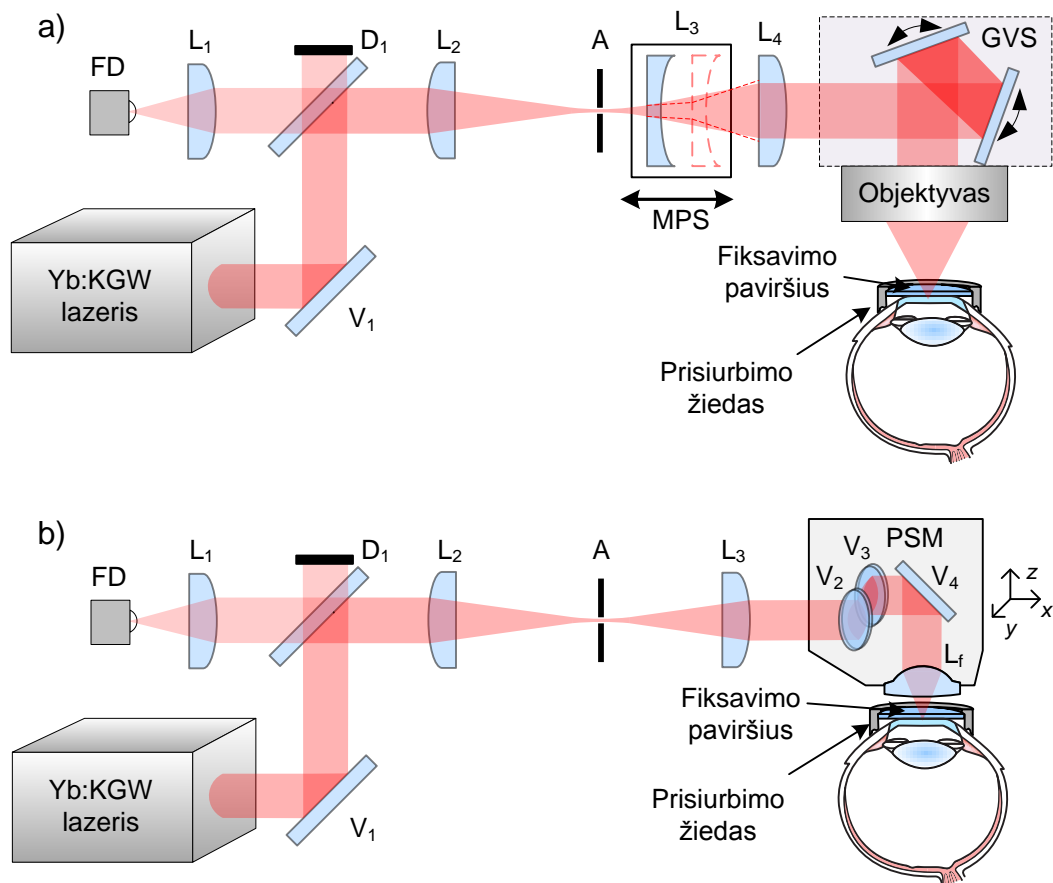
Femto-LASIK procedūros metu, ragenos lopus suformuojamas mikrometrų tikslumu valdant aštriai sufokusuotą lazerio pluoštą ragenos tūryje. Tam reikia tiksliai ir greitai skenuoti didelio pasikartojimo dažnio impulsus ~ 1 cm skersmens zonoje išlaikant pastovų fokusavimo gylių. Realizuoti tokią procedūrą galima dviem būdais. Pirmas būdas – valdant lazerio pluoštą galvanometriniiais veidrodėlių skeneriais per specialiai šiai procedūrai pritaikytą sudėtingą objektyvą, kurio židinio nuotolis nepriklauso nuo lazerio pluošto krypties, o sufokusuotos dėmės poslinkis objektyvo židinio plokštumoje yra tiesiškai proporcingas lazerio pluošto kritimo kampui (toks objektyvas vadinamas f-theta objektyvu). Šis pluošto skenavimo būdas naudojamas daugelyje komercinių oftalmologinių sistemų. Antras būdas – greitai x , y ir z ašių kryptimis skenuoti didelės skaitinės apertūros asferinį lęšį kartu su pluošto užvedimo veidrodėliais, išlaikant statmeną pluošto kritimo į lęšį kryptį [84].

5. Femtosekundinių aIR impulsų taikymas

Lazerinė sistema. 5.1 pav., a dalyje pateikta mūsų eksperimentuose naudotos ragenos lopo pjovimo sistemos su f-theta objektyvu principinė schema. Femtosekundinio Yb:KGW lazerio pluoštas fokusuojamas lęšiu L_2 , kurio židinio nuotolis $F_2 = 200$ mm. Šašmaukoje pluoštas išvalomas erdviiniu filtru ($125 \mu\text{m}$ skersmens keraminė diafragma). Lęšio L_3 padėtis valdoma motorizuotu poslinkio staliuku (MPS), taip realizuojamas pluošto fokusuavimo gylio keitimas ragenos tūryje. 8 mm skersmens pluoštas (išmatuota $1/e^2$ maksimalaus intensyvumo lygyje „peilio ašmenų“ metodu) valdomas galvanometriniiais veidrodėlių skeneriais GVS bei fokusuojamas $F = 50$ mm židinio nuotolio f-theta objektyvu. Objektyvas buvo sumodeliuotas ir pagamintas specialiai lopo pjovimo procedūrai. Jis buvo sudarytas tik iš trijų optinių elementų, o jo skaitinė apertūra $NA \approx 0,1$, todėl lazerio pluoštas buvo fokusuojamas į maždaug $9 \mu\text{m}$ skersmens dėmę ($1/e^2$ maksimalaus intensyvumo lygyje). Praktikoje naudojamų lopo formavimo sistemų objektyvai yra žymiai sudėtingesni, jų skaitinė apertūra siekia 0,3 [101] ir pluoštą fokusuoja į gerokai mažesnes, vos kelių mikrometrų skersmens dėmes. Dėl to buvo sunku tikėtis, kad naudojant turimą f-theta lęšį, ragenos paviršius po lopo atidalinimo bus labai lygus.

Prieš lopo formavimo procedūrą akies ragenos paviršius priglaudžiamas prie plokščio 1 mm storio stikliuko ir imobilizuojamas prisiurbimo žiedu (5.1 pav., a). Akies fiksavimo paviršius taip pat naudojamas fokusavimo gylio kalibravimui prieš lopo atidalinimo procedūrą. Judant motorizuotam poslinkio staliukui su lęšiu L_3 , keičiasi objektyvu fokusuojamo pluošto šašmaukos padėtis. Slenkant poslinkio staliuką pastoviu greičiu ir registruojant fotodiodo FD signalą, gaunama iš pluošto šašmaukos atsispindėjusios ir per fokusavimo objektyvą grįžusios šviesos intensyvumo priklausomybė nuo poslinkio staliuko koordinatės. Šiuo atveju diafragma A veikia kaip filtras, kuris praleidžia tik iš pluošto šašmaukos atsispindėjusią šviesą. Todėl fotodiodu FD išmatuotoje konfokalinio atsako priklausomybėje nuo poslinkio staliuko koordinatės bus matomos dvi smailės, kurių padėtys atitiks fiksavimo stikliuko apatinio ir viršutinio paviršiaus koordinates. Tokiu būdu rasta apatinio stikliuko paviršiaus koordinatė vėliau naudojama kaip atskaitos taškas parenkant fokusavimo gylį ragenoje, o atstumas tarp smailių (žinant stikliuko lūžio rodiklį ir stikliuko storį) naudojamas žingsninio variklio padėties susiejimui su pluošto šašmaukos padėtimi.

Ragenos lopas formuojamas lazerio pluoštą skenuojant spirale iš lopo krašto į centrą. Pavieniais lazerio impulsais sukurti burbuliukai fiksuotame ragenos gylyje formuoja ištisinį burbuliukų sluoksnį. Po to pjaunamas lopo



5.1 pav. Ragenos lopo atidalinimui skirtų pluošto valdymo sistemų principinės schemas: a) sistema su f-theta objektyvu ir galvanometriniais veidrodėlių skeneriais ir b) sistema su skenuojamu didelės skaitinės apertūros lęšiu. L_1 – L_4 – singletiniai lęšiai, V_1 – V_4 – dielektriniai veidrodžiai, D_1 – daliklis, A – apertūra, FD – fotodiodas, MPS – motorizuotas poslinkio staliukas, GVS – galvanometriniai veidrodėlių skeneriai, PSM – pluošto skenavimo modulis, L_f – didelės skaitinės apertūros fokusuojantis lęšis.

kraštas – lazerio pluoštas skenuojamas maždaug 320° lanku ir keičiant lęšio L_3 padėtį tolygiai mažinamas fokusavimo gylis. Taip suformuojamas pjūvis nuo ragenos tūryje sukurto burbuliukų sluoksnio iki ragenos paviršiaus, krašte paliekamas apie 40° neįpjautas vyris lopo atvertimui.

5.1 pav., b dalyje pateikta intrastrominių ragenos pjūvių formavimo, naudojant didelės skaitinės apertūros lęšį, principinė optinė schema. Lazerio pluošto skersmuo parenkamas naudojant iš dviejų teigiamų L_2 ir L_3 lęšių sudarytą teleskopą, o pluošto intensyvumo skirstinys papildomai išvalomas L_2 lęšio židinyje patalpinus keraminę apertūrą A . Lazerio pluošto sąsmaukos padėtis akies ragenoje keičiama valdant veidrodėlių V_2 – V_4 ir fokusuojančio lęšio L_f padėtis x , y ir z kryptimis. Šioje schemoje akies fiksavimo paviršiaus padėties nustatymui taip pat naudojamas konfokalinis metodas. Nuo fiksa-

5. Femtosekundinių aIR impulsų taikymas

vimo stikliuko paviršiaus atspindėjusi šviesa grįžta per fokusavimo optiką atgal pro apertūrą A ir, praėjusi pro daliklį D₁, registruojama fotodiodu FD.

Abiem aprašytoms ragenos lopo pjovimo sistemoms LabView programavimo aplinkoje buvo parašytos atskiros valdymo programos, leidžiančios keisti įvairius pjovimo parametrus: lopo skersmenį, atstumą tarp lazerio impulsų, lopo storį, lopo krašto pjovimo parametrus, impulsų energiją, lopo vyrio padėtį bei dydį. Sukurtos programos taip pat leido atlikti ne vien tik LASIK lopo formavimą, bet ir SMI^{LE} ir FLE^x refrakcijos korekcijos procedūras.

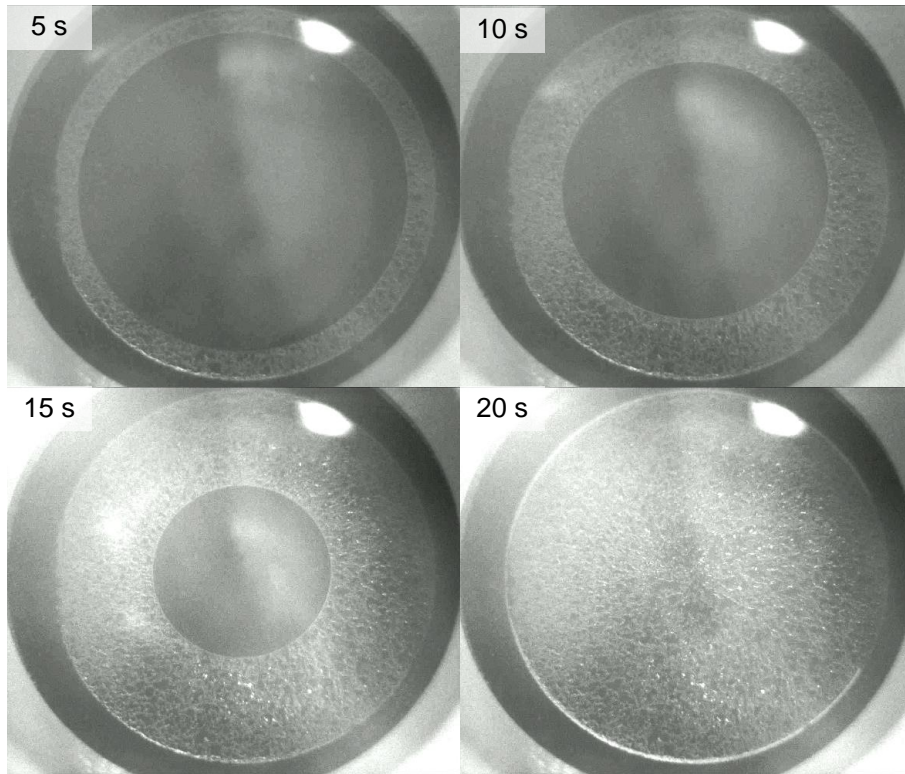
5.1 Ragenos lopo formavimas naudojant f-theta objektyvą

Atlikus eksperimentus su *ex vivo* kiaulių akimis buvo rasti optimalūs ragenos lopo formavimo parametrai, jie pateikti 5.1 lentelėje. Naudojant šiuos parametrus suformuotas ragenos lopus gana lengvai atskiriamas mentele. Lopo formavimo *ex vivo* kiaulės akyje eiga pavaizduota 5.2 pav. Visa 10 mm skersmens ragenos lopo ir jo krašto formavimo procedūra užtruko 20 s.

5.3 pav. pateiktas *ex vivo* kiaulės ragenos lopo, suformuoto naudojant f-theta objektyvą, vaizdas prieš atvertimą, po atvertimo ir jį užvertus. Kaip matyti iš 5.3 pav. a dalies ir 5.2 pav., ragenoje suformuojamas taisyklin-

5.1 lentelė Optimalūs *ex vivo* kiaulės ragenos lopo formavimo parametrai.

Parametras	Vertė
Impulsų pasikartojimo dažnis	200 kHz
Impulso energija	1,0 μ J
Impulso trukmė	300 fs
Pluošto skersmuo sąsmaukoje	$\sim 9 \mu$ m
Atstumas tarp spiralės linijų	8 μ m
Atstumas tarp impulsų linijoje	3 μ m
Atstumas tarp linijų pjaunant kraštą	3 μ m
Lopo skersmuo	10 mm
Lopo formavimo trukmė	20 s
Lopo storis	110–250 μ m
Ragenos paviršiaus fiksavimas	Prie plokščio stiklo
Pluošto skenavimas	Spirale



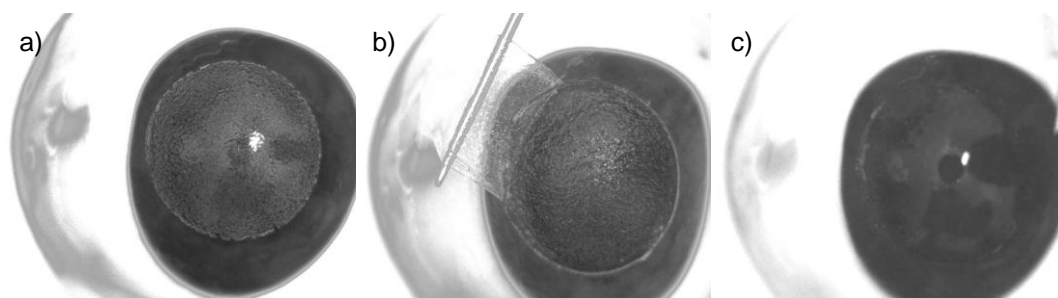
5.2 pav. Ragenos lopo formavimas fokusuojant galvanometrinius veidrodžiais valdomą impulsinį lazerio pluoštą f-theta objektyvu. Viršutiniame kairiajame kampe pažymėtas laikas, praėjęs nuo procedūros pradžios.

gos geometrijos ištisinis burbuliukų sluoksnis. Kadangi lazerio pluoštas buvo skenuojamas galvanometrinių veidrodėlių skeneriais ir fokusuojamas f-theta objektyvu, fokusavimo kokybė lopo centre ir kraštuose šiek tiek skyrėsi. Centre lazerio pluoštas buvo fokusuojamas į mažesnę dėmę (didesnis spinduliuotės intensyvumas), todėl lopo centre susiformavo šiek tiek didesni burbuliukai nei periferijoje (5.2 pav., 20 s).

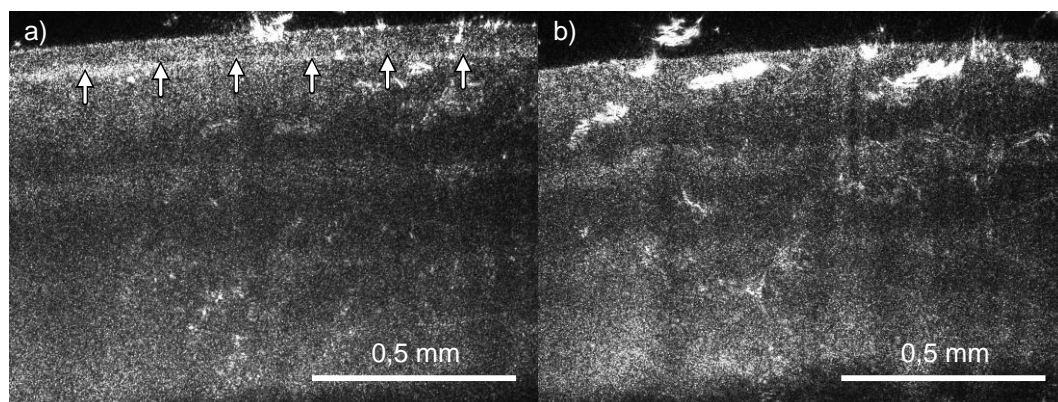
Atvertus lopa, ragenos stromos paviršius buvo grublėtas ir sklaidė šviesą (5.3 pav., b), tačiau užlašinus skysčio ir gražinus lopa atgal ragena atrodė gana skaidri ir lygi (5.3 pav., c). Iš karto po lopo atidalinimo gilesniuose stromos sluoksniuose kartais matydavosi pavieniai burbuliukai, kurie per kelias minutes išnykdavo.

Norėdami įvertinti suformuoto lopo storį bei jo tolygumą, ragenos skersinį pjūvį stebėjome naudodami plyšinį pašvietimą (žr. 3.12 pav.). Tam, kad būtų ryškiai matoma lopo apatinio paviršiaus riba, reikėjo sumažinti šviesos sklaidą nuo femtosekundiniais impulsais suformuotų burbuliukų. Burbuliukai buvo pašalinti ragenos lopa mechaniškai atskyrus mentele, bet paliekant lopa neatversta. Ragenos skersinio pjūvio vaizdas su mechaniškai atidalintu lopa prieš atverčiant (a) ir jį pilnai atvertus (b) pateikiamas 5.4 pav. Kaip

5. Femtosekundinių aIR impulsų taikymas



5.3 pav. F-theta objektyvu suformuotas $\sim 100 \mu\text{m}$ storio ragenos lopas: a) burbuliukų sluoksnis prieš atverčiant lopą, b) stromos paviršius atvertus lopą ir c) ragenos paviršius užvertus lopą.

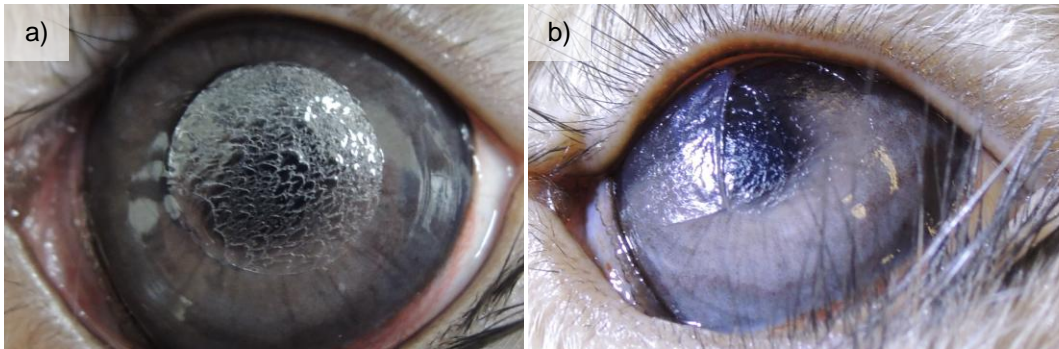


5.4 pav. *Ex vivo* kiaulės ragenos skerspjūvio vaizdas suformavus $\sim 100 \mu\text{m}$ storio lopo a) prieš lopo atvertimą ir b) atvertus lopą. Rodyklės žymi femtosekundiniais impulsais suformuotą pjūvį.

matyti iš šio paveikslėlio ragenos lopo storis yra gana tolygus visoje stebėtoje zonoje. Pagal poslinkio staliuko padėtį (žr. 3.12 pav.) įvertintas lopo storis $\sim 100 \mu\text{m}$.

Reikia pažymėti, kad nepaisant to, jog suformuotą *ex vivo* lopą pavyko gana lengvai atidalinti, ragenos stromos paviršius atvertus lopą buvo nelygus. Tai galima sieti su gana nedidele naudoto objektyvo skaitine apertūra $NA \approx 0,1$. Taip pat atliekant lopo formavimo eksperimentus buvo pastebėta, kad pjūvio formavimo gylis mažėja didinant impulso energiją, t. y. viršijama kritinė pluošto fokusavimosi galia (žr. 1.10 formulę). Tai patvirtina M. Miclea ir bendraautorių stebėtą fokusavimo gylio mažėjimą *ex vivo* kiaulės ragenoje, kai didinama impulso energija, o fokusavimui naudojamas mažos skaitinės apertūros objektyvas $NA = 0,086$ [102].

Kadangi *ex vivo* kiaulės ragenoje suformuoti lopai gana lengvai atsiversdavo, pabandėme suformuoti ragenos lopą *in vivo* triušio ragenoje. Naudojant tuos pačius spinduliuotės parametrus kaip ir *ex vivo* kiaulės ragenoje (žr. 5.1 lentelę), buvo suformuotas burbuliukų sluoksnis, tačiau atversti lo-



5.5 pav. *In vivo* triušio ragenoje suformuotas lopus a) prieš atidalinimą ir b) iš dalies atvertus.

po nepavyko. Padidinus impulso energiją iki $2,5 \mu\text{J}$ bei sumažinus atstumą tarp skenavimo spiralės vijų nuo $8 \mu\text{m}$ iki $4 \mu\text{m}$, *in vivo* triušio ragenoje buvo suformuotas didelių burbulų sluoksnis (5.5 pav., a) ir lopą iš dalies pavyko atversti, tačiau stromos paviršius atrodė labai nelygus (5.5 pav., b).

Atsižvelgiant į gautus rezultatus, galima daryti išvadą, kad mūsų eksperimentuose naudota sistema su *f*-theta objektyvu turi būti patobulinta, siekiant ją panaudoti tolimesniems taikymams. Norint pagerinti intrastrominių pjūvių kokybę bei užtikrintai kontroliuoti pjūvių gylį, būtina didinti fokusuojančiosios optikos skaitinę apertūrą.

5.2 Ragenos lopo ir refrakcinio pokyčio formavimas skenuojant didelės skaitinės apertūros lęšį

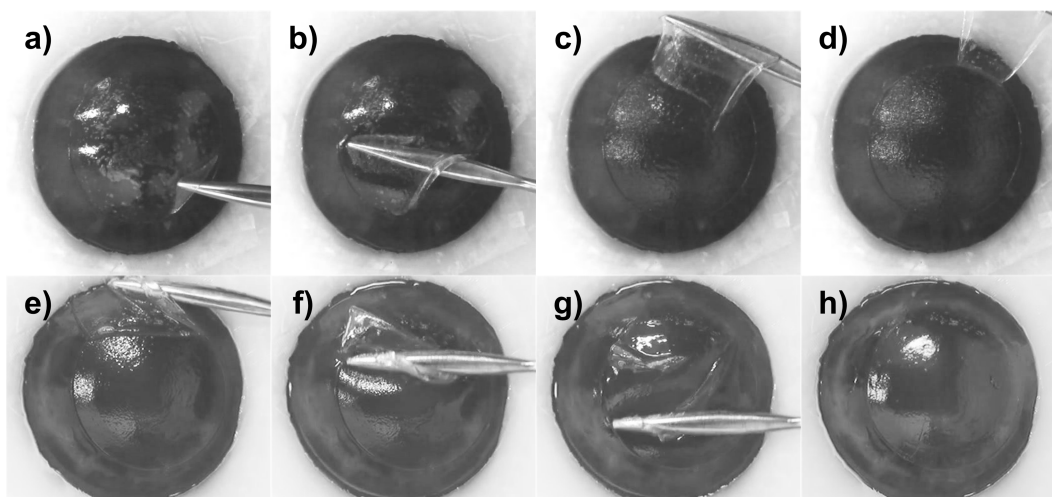
Ragenos lopo pjovimo bandymus atlikome *ex vivo* kiaulės akyje, naudodami $NA \approx 0,3$ skaitinės apertūros lęšį. Lopo pjovimo parametrai pateikti 5.2 lentelėje.

Skenuojant didelės skaitinės apertūros lęšį suformuotas *ex vivo* kiaulės ragenos lopus atsivertė itin lengvai. Atvertus lopą ir apžiūrėjus rageną po šviesaus lauko mikroskopu, stromos paviršius atrodė lygus. Kitaip nei po lopo pjovimo naudojant *f*-theta objektyvą, gilesniuose stromos sluoksniuose atvertus lopą pašalinių burbuliukų nesimatė. Tai galima sieti su trumpesniu fokusuoto pluošto sąsmaukos ilgiu. Femtosekundiniais impulsais suformuoto lopo atvertimas ir užvertimas iliustruotas 5.6 pav. Kaip matyti iš šio paveikslėlio, stromos paviršius atvertus lopą yra gana lygus, o grąžinus lopą rageną atrodo visiškai skaidri ir lygi (5.6 pav., h).

Naudodami tuos pačius lazerio spinduliuotės parametrus atpjovėme trijų skirtingų storių lopus $250 \mu\text{m}$, $110 \mu\text{m}$ ir $30 \mu\text{m}$. Visi skirtingų storių lopus lengvai atsivertė, ir nors burbuliukų sluoksniai atrodė skirtingai (didžiausi

5.2 lentelė *Ex vivo* kiaulės ragenos lopo formavimo parametrai.

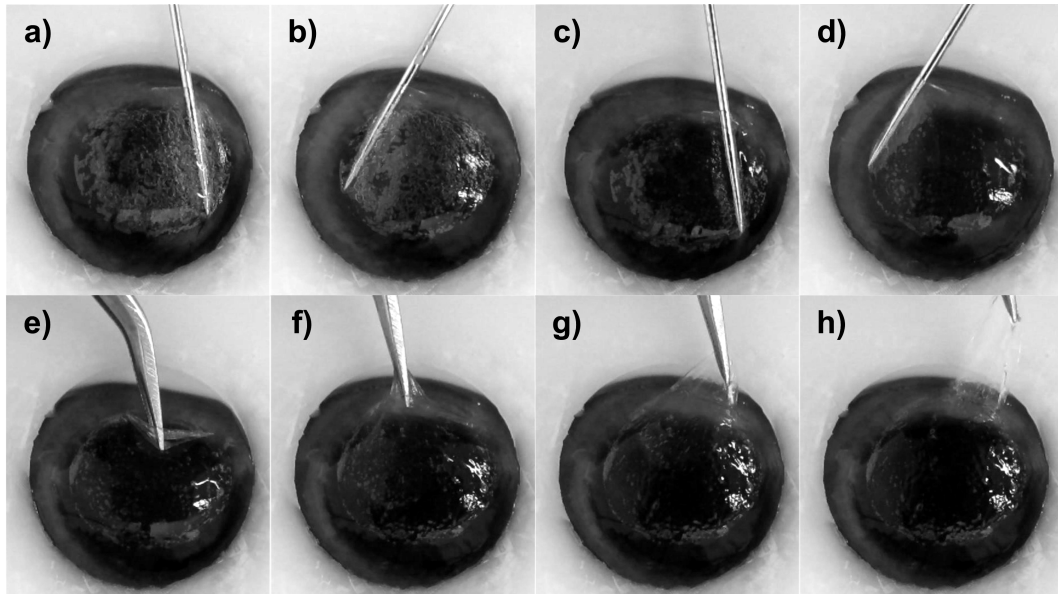
Parametras	Vertė
Impulsų pasikartojimo dažnis	1 MHz
Impulso energija	0,16 μ J
Impulso trukmė	\sim 325 fs
Pluošto skersmuo sąsmaukoje	\sim 4 μ m
Atstumas tarp impulsų	3 μ m
Atstumas tarp linijų pjaunant kraštą	3 μ m
Lopo skersmuo	9 mm
Lopo formavimo trukmė	\sim 12 s
Lopo storis	30–250 μ m
Ragenos paviršiaus fiksavimas	Prie plokščio stiklo



5.6 pav. Femtosekundiniais impulsais suformuoto ragenos lopo atvertimas (a–d) ir užvertimas (e–h).

burbuliukai susiformuodavo pjaunant ploną lopa, mažiausi – storą), tačiau stromos paviršių nelygumai vertinant mikroskopu nesiskyrė. Atpjovus daugiau kaip 30 vienodų, 110 μ m storio lopų, visus pavyko atversti neįplėšiant. Išmatavus 12 *ex vivo* ragenos lopų storį apskaičiuotas vidutinis storis buvo $(109,2 \pm 12,4) \mu$ m. Palyginimui galima paminėti, kad ragenos lopa pjaunant mechaniniu būdu (chirurginiu mikrokeratomu), standartinis lopo storio nuokrypis nuo vidutinės storio vertės įprastai būna 15–35 μ m [187, 188].

Kadangi pavyko atpjauti ir sėkmingai atversti ploną 30 μ m lopa, pabandėme atlikti ir SmILE procedūrą. 110 μ m gylyje atpjovėme 140 μ m centrinio storio lęšio pavidalo sluoksnį, atitinkantį -5 D refrakcijos pokytį 8 mm skersmens zonoje. Tam, kad būtų įmanoma ištraukti visą suformuotą struktūrą išvengiant atplyšimo periferijoje, lazerio pluošto valdymo programo-

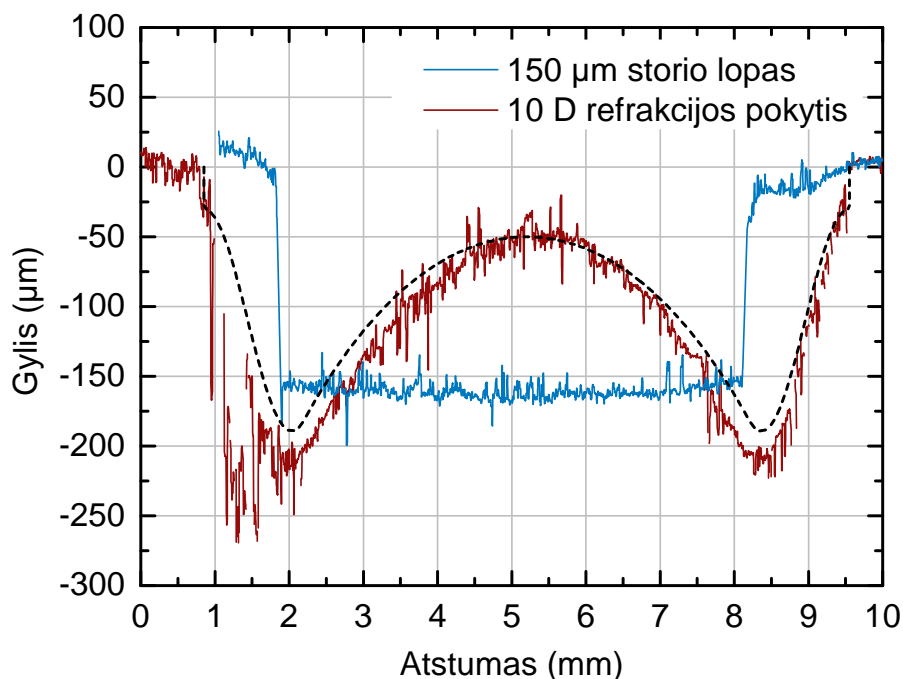


5.7 pav. Ragenos lęšiuo ištraukimas pro siaurą įpjovą: ragenos stromos lęšiuo apatinio paviršiaus atidalinimas (a ir b), viršutinio pjūvio atskyrimas (c ir d), lęšiuo ištraukimas pincetu (e–h).

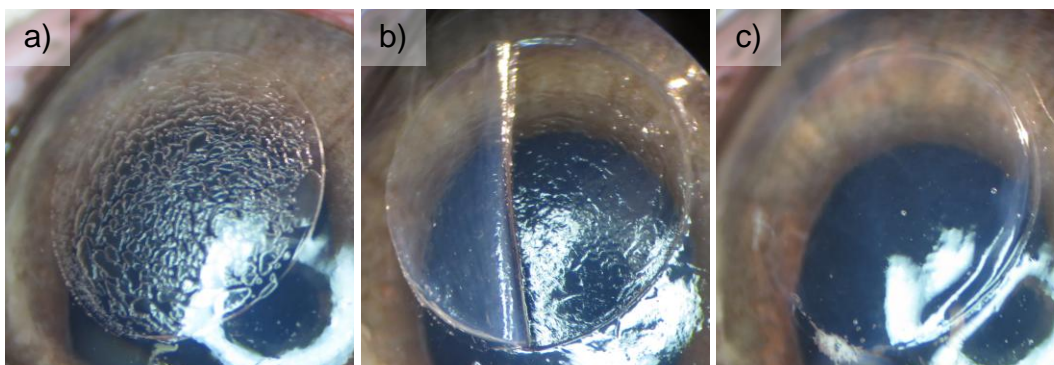
je buvo nustatytas minimalus $15\ \mu\text{m}$ ragenos stromos storis pjovimo zonos krašte (ploniausias išpjautos struktūros stromos sluoksnis). Suformuotą struktūrą ištraukėme pro siaurą ($\sim 5\ \text{mm}$) įpjovą ragenos periferijoje (žr. 5.7 pav.). Kadangi femtosekundiniais impulsais suformuotas lęšiuo pakankamai plonas, tai daugiausiai laiko užtruko bandymai atskirti, kuris pjūvio paviršius yra viršutinis, o kuris apatinis. Atskyrus, kur viršus ir kur apačia pincetu ištraukti visą lęšiuo nebuvo sunku. Po procedūros ragena atrodė skaidri ir lygi (žr. 5.7 pav., h). Ištrauktas lęšiuo buvo vientisas, taisyklingai apvalios formos.

Kadangi ragena greitai džiūsta ir laikui bėgant keičia savo formą, tiesiogiai įvertinti lopo tolygumą bei paviršiaus kokybę nėra lengva. Paviršiaus charakterizavimui naudojant optinį konfokalinį profilometrą, matavimo procedūra trunka kelias minutes, todėl sunku gauti patikimus rezultatus. Norėdami įvertinti ragenos stromos nelygumus atvertus lopa, bei suformuoto ragenos lopo tolygumą iš karto po lopo atvertimo gaminome ragenos stromos paviršiaus klijų kaukes. Kadangi sustingusios klijų kaukės gerai išlaiko savo formą, jų paviršius galima vėliau išmatuoti standartiniu profilometru.

Kaukių gamybai buvo naudojami nuo UV spinduliuotės kietėjantys klijai OP-4-20641 (Dymax, JAV). Darant ragenos lopo kaukes, lazeriu atpjautas audinys užtiesiamas ant plokščio tefloninio paviršiaus ir išlyginamas mentele. Švelnia oro srove nusausintas paviršius užliejamas klijais bei iš viršaus uždengiamas stikliuku, suteikiančiu kaukei stabilumo. Sukietinti klijai ga-



5.8 pav. 150 μm storio ragenos lopo (mėlyna linija) ir 10 D hipermetropinės korekcijos (raudona linija) klijų kaukių skerspjūvio profiliai. Juodu punktyru pažymėtas užprogramuoto 10 D pokyčio pjovimo profilis.



5.9 pav. *In vivo* triušio akyje a) suformuotas ragenos lopus, b) ragenos stromos paviršius atvertus lopą ir c) rageną užvertus lopą.

na lengvai atšoka nuo tefloninio paviršiaus, o ragenos audinio dalis smailiu pincetu atsargiai pašalinama nuo klijų kaukės. Skenuojamu didelės skaitinės apertūros lęšiu suformuoto 150 μm storio ragenos lopo paviršiaus klijų kaukės profilis pateiktas 5.8 pav. (mėlyna linija). Kaip matyti iš šio paveikslėlio, lopo storis visame skerspjūvyje yra gana tolygus ir artimas numatytai 150 μm vertei. Kadangi stromos paviršius po lopo atvertimo atrodė pakankamai lygus, kilo idėja nuo ragenos paviršiaus pašalinti hipermetropinę korekciją atitinkančią struktūrą. Kaip ir ragenos lopus, taip ir ši struktūra *ex vivo* kiaulės ragenoje atsivertė gana lengvai, o pašalintas ragenos sluoksnis buvo vientisas. Šio pašalinto ragenos darinio klijų kaukės skersinis profilis

raudona linija pavaizduotas 5.8 pav. Nepaisant to, jog ploni, didelių skersinių matmenų ragenos sluoksniai replikų ruošimo metu užklojus ant teflono paviršiaus ir bandant ištiesinti galėjo šiek tiek padžiūti ir/ar deformuotis, geometrinė forma išliko artima užprogramuotai pjovimo funkcijai (juoda punktyrinė linija 5.8 pav.). 8 mm skersmens 150 μm storio ragenos lopo formavimo procedūra užtruko ~ 12 s, o 8,7 mm skersmens hipermetropinės 10 D korekcijos ~ 30 s.

Ragenos lopo formavimo eksperimentus atlikome dviems triušiams. *In vivo* triušio akyje suformuoto ragenos lopo, kuris lengviausiai atsivertė, nuotraukos pateikiamos 5.9 pav. Kaip matyti iš šio paveikslėlio b dalies, ragenos stromos paviršius atvertus lopą atrodo gana lygus, rainelės kraštas matomas ryškiau nei po analogiškos procedūros naudojant f-theta objektyvą (žr. 5.5 pav., b). Gražinus atverstą ragenos lopą atgal, ragena išlieka skaidri ir lygi (5.9 pav., c).

5.3 Rezultatų aptarimas

Ragenos lopo formavimui naudojant skenuojamą didelės skaitinės apertūros lęšį galima preciziškai atpjauti bei nepažeidžiant integralumo atversiti keliasdešimties mikrometrų storio ragenos sluoksnius. Kai lazerio pluoštas skenuojamas galvanometriniiais veidrodėlių skeneriais ir fokusuojamas f-theta objektyvu pluošto fokusavimo kokybė lopo centre ir krašte skiriasi. Todėl dažniausiai lopo kraštas pjaunamas naudojant didesnę impulso energiją ir/arba mažinant atstumą tarp fokusavimo dėmių [189, 190]. Tuo tarpu skenuojant didelės skaitinės apertūros lęšį lazerinio pjūvio kokybė nepriklauso nuo pjovimo vietos, todėl lopo kraštas kokybiškai atpjaunamas nemažinant skenavimo greičio ir išlaikant tą pačią impulso energiją. Valdant lazerio pluoštą x , y ir z kryptimis galima tiksliai atpjauti ne tik ragenos lopą LASIK procedūrai, bet ir suformuoti refrakcinį pokytį nenaudojant papildomo UV lazerio. Taip pat femtosekundiniais impulsais galima paruošti donoro ir recipiento ragenas keratoplastikos procedūroms, suformuoti intrastrominius pjūvius ragenos implantams, keičiant biomechanines ragenos savybes koreguoti presbiopiją.

Naudodami prototipinę femtosekundinę sistemą pademonstravome, kad *ex vivo* kiaulės akyje 9 mm skersmens ragenos lopus gali būti atpjautas per 12 s. Ši trukmė patenka į šiuo metu naudojamų komercinių sistemų trukmių diapazoną – 8–60 s [190, 191].

Sėkmingas hipermetropinės korekcijos suformavimas femtosekundiniais

5. Femtosekundinių aIR impulsų taikymas

impulsais pabrėžia mūsų kuriamos sistemos lankstumą – galima tiksliai ir greitai valdyti fokusavimo gylį ir kokybiškai atpjauti tiek plonus ($30\ \mu\text{m}$), tiek storus ($250\ \mu\text{m}$) ragenos sluoksnius. Tačiau reikėtų atlikti papildomus tyrimus, ar toks pirmą kartą pademonstruotas toliaregystės korekcijos metodas galėtų būti taikomas praktikoje. Nėra aišku, kaip gytų ragena po tokios korekcijos, ar pakankamai lygus stromos paviršius ir ar išsilaikytų norimas refrakcijos pokytis ataugus epiteliumi. Ši procedūra turėtų potencialą didelių refrakcijos ydų korekcijai – priešingai nei atliekant korekciją UV impulsais, femtosekundiniais aIR impulsais formuojant refrakcijos pokytį, procedūros trukmė nepriklauso nuo pašalinamų audinių storio.

Šiuo metu rinkoje yra tik viena lazerinė sistema, kuri gali koreguoti refrakcines ydas vien tik femtosekundiniais aIR impulsais – tai „VisuMax“ („Carl Zeiss Meditec“, Vokietija). Kitos komercinės femtosekundinės lazerinės sistemos nėra pajėgios formuoti tikslius erdvinis darinius ragenos tūryje, nes jose naudojamų fokusavimo objektyvų skaitinė apertūra nėra pakankama arba nėra numatytos techninės galimybės laisvai keisti pluošto fokusavimo gylį. Naudodami femtosekundinę Yb:KGW lazerinę sistemą mes pademonstravome, kad galime atlikti SmILE procedūrą, tiesa, kol kas tik *ex vivo* kiaulės akyje. Kai refrakcinių ydų korekcijai naudojamas vien tik femtosekundinis aIR lazeris (SmILE, FLEEx procedūros), galima išvelgti keletą privalumų: operacijos metu neužuodžiamas deginamų audinių kvapas; minimaliai pažeidžiamas epitelis; refrakcijos rezultatai nepriklauso nuo aplinkos parametrų, nes ragenos stroma pjaunama nepažeidus epitelio, išlaikant pastovų stromos hidratacijos lygį. Tačiau yra ir keletas trūkumų: kol kas nepavyksta koreguoti toliaregystės [73]; SmILE procedūra reikalauja geresnių chirurginių įgūdžių, nei įprasta LASIK procedūra [192, 193]; femtosekundiniais aIR impulsais netiksliai suformuotas refrakcijos pokytis negali būti pakoreguotas atliekant pakartotinę procedūrą femtosekundiniais impulsais, pakartotinė korekcija gali būti atlikta tik abliuojant ragenos stromą UV impulsais [74]. Mūsų kuriama femtosekundinė sistema, esant būtinybei, galėtų atlikti ir pakartotinę korekciją, naudojant femtosekundinius UV impulsus.

Apibendrinimas

Šiame darbe tyrėme femtosekundinio Yb:KGW kietojo kūno lazerio fundamentinės aIR (1026 nm) ir penktosios harmonikos UV (205 nm) spinduliuočių taikymo refrakcinėje akių chirurgijoje galimybes.

Atlikti *in vivo* tyrimai parodė, kad femtosekundiniais UV impulsais triušio ragenos stromoje per trumpą laiką galima suformuoti tikslius ir atkartojamus tūrinius darinius, o ragenos stromos paviršiaus kokybė po abliacijos nesiskiria nuo eksimeriniu ArF lazeriu abliuotų ragenų kokybės. Įvertinus ragenų gijimą po FRK ir TransFRK procedūrų pagal subepitelinės miglos dinamiką bei histologinės analizės rezultatus, nustatyta, kad po femtosekundinės abliacijos ragenos gyja taip pat, kaip ir po standartinės eksimerinio ArF lazerio abliacijos.

Naudodami vieną lazerinę sistemą pirmą kartą pademonstravome, kad vienu lazeriu galima atlikti pilną Femto-LASIK refrakcinių ydų korekcijos procedūrą.

UV spinduliuotės poveikio tyrimai naudojant pelių kaulų čiulpų ir odos epitelio ląsteles parodė, kad femtosekundiniai 205 nm impulsai neviršija oftalmologijai naudojamų nanosekundinių 213 nm bangos ilgio impulsų genotoksinio poveikio, o didelis femtosekundinių (205 nm) impulsų citotoksinis poveikis gali būti laikomas privalumu, nes mažėja tikimybė ląstelėms mutuoti.

Visi mūsų atlikti tyrimai rodo, jog femtosekundinio Yb:KGW lazerio pagrindu sukurta sistema yra universalus chirurginis instrumentas, galintis atlikti daugelį šiuolaikinių (o gal ir naujų) oftalmologinių procedūrų.

Literatūra

- [1] E. Dolgin, The myopia boom, *Nature* **519**(7543), 276–278 (2015).
- [2] I. G. Morgan, K. Ohno-Matsui, S.-M. Saw, Myopia, *Lancet* **379**(9827), 1739–1748 (2012).
- [3] S. Vitale, R. D. Sperduto, F. L. Ferris, Increased prevalence of myopia in the United States between 1971-1972 and 1999-2004, *Arch. Ophthalmol.* **127**(12), 1632–1639 (2009).
- [4] S. Jobke, E. Kasten, C. Vorwerk, The prevalence rates of refractive errors among children, adolescents, and adults in Germany, *Clin. Ophthalmol.* **2**(3), 601 (2008).
- [5] S.-M. Saw, Y.-H. Chan, W.-L. Wong, A. Shankar, M. Sandar, T. Aung, D. T. Tan, P. Mitchell, T. Y. Wong, Prevalence and risk factors for refractive errors in the Singapore Malay Eye Survey, *Ophthalmology* **115**(10), 1713–1719 (2008).
- [6] M. G. Villarreal, J. Ohlsson, M. Abrahamsson, A. Sjöström, J. Sjöstrand, Myopisation: The refractive tendency in teenagers. Prevalence of myopia among young teenagers in Sweden, *Acta Ophthalmol. Scand.* **78**(2), 177–181 (2000).
- [7] C.-W. Pan, D. Ramamurthy, S.-M. Saw, Worldwide prevalence and risk factors for myopia, *Ophthalmic Physiol. Opt.* **32**(1), 3–16 (2012).
- [8] J. F. Wu, H. S. Bi, S. M. Wang, Y. Y. Hu, H. Wu, W. Sun, T. L. Lu, X. R. Wang, J. B. Jonas, Refractive error, visual acuity and causes of vision loss in children in Shandong, China. The Shandong children eye study, *PLoS ONE* **8**(12), e82763 (2013).
- [9] J. M. Ip, S.-M. Saw, K. A. Rose, I. G. Morgan, A. Kijley, J. J. Wang, P. Mitchell, Role of near work in myopia: Findings in a sample of Australian school children, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**(7), 2903 (2008).

- [10] D. O. Mutti, G. L. Mitchell, M. L. Moeschberger, L. A. Jones, K. Zadnik, Parental myopia, near work, school achievement, and children's refractive error, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**(12), 3633–3640 (2002).
- [11] T. Teasdale, E. Goldschmidt, Myopia and its relationship to education, intelligence and height: preliminary results from an on-going study of Danish draftees, *Acta Ophthalmol. Suppl.* **66**(S185), 41–43 (1988).
- [12] T. Y. Wong, P. J. Foster, T. P. Ng, J. M. Tielsch, G. J. Johnson, S. K. Seah, Variations in ocular biometry in an adult Chinese population in Singapore: The Tanjong Pagar Survey, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**(1), 73–80 (2001).
- [13] L. S. Lim, S.-M. Saw, V. Jeganathan, W. T. Tay, T. Aung, L. Tong, P. Mitchell, T. Y. Wong, Distribution and determinants of ocular biometric parameters in an Asian population: The Singapore Malay eye study, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**(1), 103–109 (2010).
- [14] S.-M. Saw, G. Gazzard, E. C. Shih-Yen, W.-H. Chua, Myopia and associated pathological complications, *Ophthalmic Physiol. Opt.* **25**(5), 381–391 (2005).
- [15] D. Z. Reinstein, T. J. Archer, M. Gobbe, The history of LASIK, *J. Refract. Surg.* **28**(4), 291–298 (2012).
- [16] M. Ghoreishi, A. Naderi Beni, Z. Naderi Beni, Visual outcomes of Femto-LASIK for correction of residual refractive error after corneal graft, *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **251**(11), 2601–2608 (2013).
- [17] I. Ratkay-Traub, T. Juhasz, C. Horvath, C. Suarez, K. Kiss, I. Ferincz, R. Kurtz, Ultra-short pulse (femtosecond) laser surgery: Initial use in LASIK flap creation, *Ophthalmol. Clin. North. Am.* **14**(2), 347–55 (2001).
- [18] P. S. Binder, Flap dimensions created with the IntraLase FS laser, *J. Cataract Refract. Surg.* **30**(1), 26–32 (2004).
- [19] I. Ratkay-Traub, I. E. Ferincz, T. Juhasz, R. M. Kurtz, R. R. Krueger, First clinical results with the femtosecond neodymium–glass laser in refractive surgery, *J. Refract. Surg.* **19**(2), 94–103 (2002).

- [20] K. Stonecipher, T. S. Ignacio, M. Stonecipher, Advances in refractive surgery: microkeratome and femtosecond laser flap creation in relation to safety, efficacy, predictability, and biomechanical stability, *Curr. Opin. Ophthalmol.* **17**(4), 368–372 (2006).
- [21] A. A. Farjo, A. Sugar, S. C. Schallhorn, P. A. Majmudar, D. J. Tanzer, W. B. Trattler, J. B. Cason, K. E. Donaldson, G. D. Kymionis, Femtosecond lasers for LASIK flap creation: A report by the American Academy of Ophthalmology, *Ophthalmology* **120**(3), e5–e20 (2013).
- [22] J. A. Davison, S. C. Johnson, Intraoperative complications of LASIK flaps using the intralase femtosecond laser in 3009 cases, *J. Refract. Surg.* **26**(11), 851 (2010).
- [23] M. Tanna, S. C. Schallhorn, K. A. Hettinger, Femtosecond laser versus mechanical microkeratome: A retrospective comparison of visual outcomes at 3 months, *J. Refract. Surg.* **25**(7), S668–S671 (2009).
- [24] D. S. Durrie, G. M. Kezirian, Femtosecond laser versus mechanical keratome flaps in wavefront-guided laser *in situ* keratomileusis: Prospective contralateral eye study, *J. Cataract Refract. Surg.* **31**(1), 120–126 (2005).
- [25] A. Dubietis, G. Tamošauskas, A. Varanavičius, G. Valiulis, Two-photon absorbing properties of ultraviolet phase-matchable crystals at 264 and 211 nm, *Appl. Optics* **39**(15), 2437–2440 (2000).
- [26] S. Wu, G. A. Blake, S. Sun, J. Ling, A multicrystal harmonic generator that compensates for thermally induced phase mismatch, *Opt. Commun.* **173**(1), 371–376 (2000).
- [27] C. Rothhardt, J. Rothhardt, A. Klenke, T. Peschel, R. Eberhardt, J. Limpert, A. Tünnermann, BBO-sapphire sandwich structure for frequency conversion of high power lasers, *Opt. Mater. Express* **4**(5), 1092–1103 (2014).
- [28] Y. Yap, K. Deki, N. Kitatochi, Y. Mori, T. Sasaki, Alleviation of thermally induced phase mismatch in CsLiB₆O₁₀ crystal by means of temperature-profile compensation, *Opt. Lett.* **23**(13), 1016–1018 (1998).
- [29] H. Kouta, Y. Kuwano, Attaining 186-nm light generation in cooled β -BaB₂O₄ crystal, *Opt. Lett.* **24**(17), 1230–1232 (1999).

- [30] A. M. Roszkowska, G. Korn, M. Lenzner, M. Kirsch, O. Kittelmann, R. Zatonski, P. Ferreri, G. Ferreri, Experimental and clinical investigation of efficiency and ablation profiles of new solid-state deep-ultraviolet laser for vision correction, *J. Cataract Refract. Surg.* **30**(12), 2536–2542 (2004).
- [31] I. Anderson, D. R. Sanders, P. van Saarloos, W. J. Ardrey IV, Treatment of irregular astigmatism with a 213 nm solid-state, diode-pumped neodymium: YAG ablative laser, *J. Cataract Refract. Surg.* **30**(10), 2145–2151 (2004).
- [32] N. S. Tsiklis, G. D. Kymionis, G. A. Kounis, A. I. Pallikaris, V. F. Diakonis, S. Charisis, M. M. Markomanolakis, I. G. Pallikaris, One-year results of photorefractive keratectomy and laser *in situ* keratomileusis for myopia using a 213 nm wavelength solid-state laser, *J. Cataract Refract. Surg.* **33**(6), 971–977 (2007).
- [33] A. M. Roszkowska, L. De Grazia, P. Ferreri, G. Ferreri, One-year clinical results of photorefractive keratectomy with a solid-state laser for refractive surgery, *J. Refract. Surg.* **22**(6), 611 (2006).
- [34] N. S. Tsiklis, G. D. Kymionis, G. A. Kounis, I. I. Naoumidi, I. G. Pallikaris, Photorefractive keratectomy using solid state laser 213 nm and excimer laser 193 nm: A randomized, contralateral, comparative, experimental study, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**(4), 1415–1420 (2008).
- [35] T. Seiler, G. Kahle, M. Kriegerowski, Excimer laser (193 nm) myopic keratomileusis in sighted and blind human eyes, *Refract. Corneal Surg.* **6**(3), 165–173 (1989).
- [36] www.katanalaser.com, tikrinta 2015-06-15.
- [37] P. P. Van Saarloos, J. Rodger, Histological changes and unscheduled DNA synthesis in the rabbit cornea following 213-nm, 193-nm, and 266-nm irradiation, *J. Refract. Surg.* **23**(5), 477–481 (2007).
- [38] M. H. Niemz, *Laser-Tissue Interactions: Fundamentals and Applications* (Springer, Berlin Heidelberg, 2007).
- [39] F. Guarnieri, *Corneal Biomechanics and Refractive Surgery* (Springer, New York, 2014).
- [40] M. Bass, *Handbook of Optics: Volume III – Vision and Vision Optics, Third Edition* (McGraw-Hill, New York, 2010).

- [41] G. Smith, D. A. Atchison, *The Eye and Visual Optical Instruments* (Cambridge University Press, Cambridge, 1997).
- [42] D. J. Cunningham, *Textbook of Anatomy* (W. Wood, New York, 1906).
- [43] B. Zuberbuhler, S. Tuft, D. Gartry, D. Spokes, *Corneal Surgery* (Springer, Berlin Heidelberg, 2013).
- [44] A. Vogel, V. Venugopalan, Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues, *Chem. Rev.* **103**(2), 577–644 (2003).
- [45] F. M. Polack, Morphology of the cornea: I. Study with silver stains, *Am. J. Ophthalmol.* **51**(5), 1051–179 (1961).
- [46] L. J. Müller, E. Pels, G. F. Vrensen, The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature, *Br. J. Ophthalmol.* **85**(4), 437–443 (2001).
- [47] D. Lee, G. Wilson, Non-uniform swelling properties of the corneal stroma, *Curr. Eye Res.* **1**(8), 457–461 (1981).
- [48] D. Cogan, V. E. Kinsey, Transfer of water and sodium chloride by osmosis and diffusion through the excised cornea, *Arch. Ophthalmol.* **27**, 466–482 (1942).
- [49] J. Tomás-Juan, A. M.-G. Larrañaga, L. Hanneken, Corneal regeneration after photorefractive keratectomy: A review, *J. Optom.* (2014).
- [50] C.-Y. Chang, C. R. Green, C. N. McGhee, T. Sherwin, Acute wound healing in the human central corneal epithelium appears to be independent of limbal stem cell influence, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**(12), 5279–5286 (2008).
- [51] S. E. Wilson, J. J. Liu, R. R. Mohan, Stromal-epithelial interactions in the cornea, *Prog. Retin. Eye Res.* **18**(3), 293–309 (1999).
- [52] R. R. Mohan, A. E. Hutcheon, R. Choi, J. Hong, J. Lee, R. R. Mohan, R. Ambrósio Jr, J. D. Zieske, S. E. Wilson, Apoptosis, necrosis, proliferation, and myofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK, *Exp. Eye Res.* **76**(1), 71–87 (2003).
- [53] J. V. Jester, W. M. Petroll, H. D. Cavanagh, Corneal stromal wound healing in refractive surgery: The role of myofibroblasts, *Prog. Retin. Eye Res.* **18**(3), 311–356 (1999).

- [54] Y. Kaji, H. Obata, T. Usui, K. Soya, R. Machinami, T. Tsuru, H. Yamashita, Three-dimensional organization of collagen fibrils during corneal stromal wound healing after excimer laser keratectomy, *J. Cataract Refract. Surg.* **24**(11), 1441–1446 (1998).
- [55] J. V. Jester, H.-F. Li, W. M. Petroll, R. D. Parker, H. D. Cavanagh, G. J. Carr, B. Smith, J. K. Maurer, Area and depth of surfactant-induced corneal injury correlates with cell death, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **39**(6), 922–936 (1998).
- [56] S. L. Trokel, R. Srinivasan, B. Braren, Excimer laser surgery of the cornea, *Am. J. Ophthalmol.* **96**(6), 710–715 (1983).
- [57] R. Ambrósio, S. E. Wilson, LASIK vs LASEK vs PRK: Advantages and indications, *Semin. Ophthalmol.* **18**(1), 2–10 (2003).
- [58] G. L. Sutton, P. Kim, Laser *in situ* keratomileusis in 2010—A review, *Clin. Experiment. Ophthalmol.* **38**(2), 192–210 (2010).
- [59] L. G. Pallikaris, M. E. Papatzanaki, E. Z. Stathi, O. Frenschok, A. Georgiadis, Laser *in situ* keratomileusis, *Lasers Surg. Med.* **10**(5), 463–468 (1990).
- [60] L. Buratto, M. Ferrari, P. Rama, Excimer laser intrastromal keratomileusis, *Am. J. Ophthalmol.* **113**(3), 291–295 (1992).
- [61] A. Sugar, C. J. Rapuano, W. W. Culbertson, D. Huang, G. A. Varley, P. J. Agapitos, V. P. de Luise, D. D. Koch, Laser *in situ* keratomileusis for myopia and astigmatism: Safety and efficacy: A report by the American Academy of Ophthalmology, *Ophthalmology* **109**(1), 175–187 (2002).
- [62] L. J. Kugler, M. X. Wang, Lasers in refractive surgery: History, present, and future, *Appl. Opt.* **49**(25), F1–F9 (2010).
- [63] D. T. Azar, R. T. Ang, J.-B. Lee, T. Kato, C. C. Chen, S. Jain, E. Gabison, J.-C. Abad, Laser subepithelial keratomileusis: Electron microscopy and visual outcomes of flap photorefractive keratectomy, *Curr. Opin. Ophthalmol.* **12**(4), 323–328 (2001).
- [64] M. Camellin, Laser epithelial keratomileusis for myopia, *J. Refract. Surg.* **19**(6), 666–670 (2002).
- [65] X.-Q. Liu, L. Xu, C.-J. Yi, Flap removal or flap preservation during LASEK surgery, *Cell Biochem. Biophys.* **57**(1), 45–48 (2010).

- [66] W. Kautek, S. Mitterer, J. Krüger, W. Husinsky, G. Grabner, Femtosecond-pulse laser ablation of human corneas, *Appl. Phys. A* **58**(5), 513–518 (1994).
- [67] T. Juhasz, G. A. Kastis, C. Suarez, Z. Bor, W. E. Bron, Time-resolved observations of shock waves and cavitation bubbles generated by femtosecond laser pulses in corneal tissue and water, *Lasers Surg. Med.* **19**(1), 23–31 (1996).
- [68] T. Juhasz, F. H. Loesel, R. M. Kurtz, C. Horvath, J. F. Bille, G. Mouro, Corneal refractive surgery with femtosecond lasers, *IEEE J. Sel. Topics Quantum Electron* **5**(4), 902–910 (1999).
- [69] L. T. Nordan, S. G. Slade, R. N. Baker, C. Suarez, T. Juhasz, R. Kurtz, Femtosecond laser flap creation for laser *in situ* keratomileusis: Six-month follow-up of initial US clinical series, *J. Refract. Surg.* **19**(1), 8–14 (2002).
- [70] R. R. Krueger, T. Juhasz, A. Gualano, V. Marchi, The picosecond laser for nonmechanical laser *in situ* keratomileusis, *J. Refract. Surg.* **14**(4), 467–469 (1997).
- [71] W. Sekundo, K. Kunert, C. Russmann, A. Gille, W. Bissmann, G. Stobrawa, M. Sticker, M. Bischoff, M. Blum, First efficacy and safety study of femtosecond lenticule extraction for the correction of myopia: Six-month results, *J. Cataract Refract. Surg.* **34**(9), 1513–1520 (2008).
- [72] W. Sekundo, K. S. Kunert, M. Blum, Small incision corneal refractive surgery using the small incision lenticule extraction (SMILE) procedure for the correction of myopia and myopic astigmatism: Results of a 6 month prospective study, *Br. J. Ophthalmol.* **95**(3), 335–339 (2011).
- [73] M. Blum, K. S. Kunert, U. Voßmerbäumer, W. Sekundo, Femtosecond lenticule extraction (ReLEx®) for correction of hyperopia – first results, *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **251**(1), 349–355 (2013).
- [74] A. K. Riau, R. I. Angunawela, S. S. Chaurasia, D. T. Tan, J. S. Mehta, Effect of different femtosecond laser-firing patterns on collagen disruption during refractive lenticule extraction, *J. Cataract Refract. Surg.* **38**(8), 1467–1475 (2012).

- [75] W. Sekundo, J. Gertnere, T. Bertelmann, I. Solomatin, One-year refractive results, contrast sensitivity, high-order aberrations and complications after myopic small-incision lenticule extraction (ReLEx SMILE), *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **252**(5), 837–843 (2014).
- [76] A. Vestergaard, A. Ivarsen, S. Asp, J. Ø. Hjortdal, Femtosecond (FS) laser vision correction procedure for moderate to high myopia: a prospective study of ReLEx® flex and comparison with a retrospective study of FS-laser *in situ* keratomileusis, *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* **91**(4), 355–362 (2013).
- [77] L. A. Ruiz, L. M. Cepeda, V. C. Fuentes, et al., Intrastromal correction of presbyopia using a femtosecond laser system, *J. Refract. Surg.* **25**(10), 847 (2009).
- [78] B. Seitz, H. Brünner, A. Viestenz, C. Hofmann-Rummelt, U. Schlötzer-Schrehardt, G. O. Naumann, A. Langenbucher, Inverse mushroom-shaped nonmechanical penetrating keratoplasty using a femtosecond laser, *Am. J. Ophthalmol.* **139**(5), 941–944 (2005).
- [79] Z. Nagy, A. Takacs, T. Filkorn, M. Sarayba, Initial clinical evaluation of an intraocular femtosecond laser in cataract surgery, *J. Refract. Surg.* **25**(12), 1053 (2009).
- [80] G. Sutton, S. J. Bali, C. Hodge, Femtosecond cataract surgery: Transitioning to laser cataract, *Curr. Opin. Ophthalmol.* **24**(1), 3–8 (2013).
- [81] G. Reggiani-Mello, R. R. Krueger, Comparison of commercially available femtosecond lasers in refractive surgery, *Expert Rev. Ophthalmol.* **6**(1), 55–65 (2011).
- [82] A. Trost, F. Schrödl, C. Strohmaier, B. Bogner, C. Runge, A. Kaser-Eichberger, K. Krefft, A. Vogel, N. Linz, S. Freidank, et al., A new nanosecond UV laser at 355 nm: Early results of corneal flap cutting in a rabbit model, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**(13), 7854–7864 (2013).
- [83] A. Vogel, S. Freidank, N. Linz, Alternativen zur Femtosekundentechnologie, *Der Ophthalmologe* **111**(6), 531–538 (2014).
- [84] D. Brooks, N. Brown, D. Savage, C. Wang, W. Knox, J. Ellis, Precision large field scanning system for high numerical aperture lenses and application to femtosecond micromachining of ophthalmic materials, *Rev. Sci. Instrum.* **85**(6), 065107 (2014).

- [85] D. E. Savage, D. R. Brooks, M. DeMagistris, L. Xu, S. MacRae, J. D. Ellis, W. H. Knox, K. R. Huxlin, First demonstration of ocular refractive change using blue-iris in live cats, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **55**(7), 4603 (2014).
- [86] A. Lembares, X.-H. Hu, G. W. Kalmus, Absorption spectra of corneas in the far ultraviolet region, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **38**(6), 1283–1287 (1997).
- [87] F. A. L'Esperance, Excimer laser instrumentation and technique for human corneal surgery, *Arch. Ophthalmol.* **107**(1), 131 (1989).
- [88] K. D. Hanna, J. Chastang, Y. Pouliquen, G. Renard, L. Asfar, G. O. Waring, Excimer laser keratectomy for myopia with a rotating-slit delivery system, *Arch. Ophthalmol.* **106**(2), 245–250 (1988).
- [89] C. W. von Mohrenfels, R. Khoramnia, C. Wüllner, C. Donitzky, J. Salgado, W. Pfäffl, C.-P. Lohmann, First clinical results of epithelial laser *in situ* keratomileusis with a 1000 Hz excimer laser, *J. Cataract Refract. Surg.* **36**(3), 449–455 (2010).
- [90] <http://www.eye-tech-solutions.com>, tikrinta 2015-06-14.
- [91] R. Khoramnia, J. P. Salgado, C. Wuellner, C. Donitzky, C. P. Lohmann, C. Winkler von Mohrenfels, Safety, efficacy, predictability and stability of laser *in situ* keratomileusis (LASIK) with a 1000-Hz scanning spot excimer laser, *Acta Ophthalmol* **90**(6), 508–513 (2012).
- [92] S. Arba-Mosquera, T. Hollerbach, Ablation resolution in laser corneal refractive surgery: The dual fluence concept of the AMARIS Platform, *Adv. Opt. Technol.* **2010** (2010).
- [93] F. E. Fantes, G. O. Waring, Effect of excimer laser radiant exposure on uniformity of ablated corneal surface, *Lasers Surg. Med.* **9**(6), 533–542 (1989).
- [94] O. Ren, R. P. Gailitis, K. P. Thompson, J. Lin, Ablation of the cornea and synthetic polymers using a UV (213 nm) solid-state laser, *Quantum Electron.* **26**(12), 2284–2288 (1990).
- [95] Q. Ren, G. Simon, J.-M. Legeais, J.-M. Parel, W. Culbertson, J. Shen, Y. Takesue, M. Savoldelli, Ultraviolet solid-state laser (213-nm) photo-refractive keratectomy: *In vivo* study, *Ophthalmology* **101**(5), 883–889 (1994).

- [96] T. Nakagawa, N. Maeda, O. Cekic, T. Fujikado, Y. Tano, A. Murakami, M. Yoshimura, Y. Mori, T. Sasaki, H. Kitano, et al., Corneal ablation with new 193 nm solid-state laser: Preliminary experiments, *J. Cataract Refract. Surg.* **34**(6), 1019–1023 (2008).
- [97] J. Noack, A. Vogel, Laser-induced plasma formation in water at nanosecond to femtosecond time scales: Calculation of thresholds, absorption coefficients, and energy density, *Quantum Electron.* **35**(8), 1156–1167 (1999).
- [98] A. Heisterkamp, T. Ripken, T. Mamom, W. Drommer, H. Welling, W. Ertmer, H. Lubatschowski, Nonlinear side effects of fs pulses inside corneal tissue during photodisruption, *App. Phys. B* **74**(4-5), 419–425 (2002).
- [99] M. Habib, M. Speaker, W. Schnatter, Mass spectrometry analysis of the by-products of intrastromal photorefractive keratectomy, *Ophthalmic Surg. Lasers* **26**(5), 481–483 (1994).
- [100] W. M. Steen, J. Mazumder, *Laser Material Processing* (Springer, London, 2010).
- [101] C. Rathjen, W. Zesch, M. Deyerler, H. Lubatschowski, T. Ripken, Ophthalmologic device for breaking down eye tissue, US Patent App. 11/449,626 (2007).
- [102] M. Miclea, U. Skrzypczak, S. Faust, F. Fankhauser, H. Graener, G. Seifert, Nonlinear refractive index of porcine cornea studied by z-scan and self-focusing during femtosecond laser processing, *Opt. Express* **18**(4), 3700–3707 (2010).
- [103] F. Dausinger, F. Lichtner, H. Lubatschowski, *Femtosecond Technology for Technical and Medical Applications* (Springer, Berlin Heidelberg, 2004).
- [104] A. Heisterkamp, T. Ripken, E. Lütkefles, W. Drommer, H. Lubatschowski, H. Welling, W. Ertmer, Optimierung der Laserparameter für die intrastromale Schnitfführung mittels ultrakurzer Laserpulse, *Der Ophthalmologe* **98**(7), 623–628 (2001).
- [105] R. Srinivasan, V. Mayne-Banton, Self-developing photoetching of poly(ethylene terephthalate) films by far-ultraviolet excimer laser radiation, *Appl. Phys. Lett.* **41**(6), 576–578 (1982).

- [106] R. Srinivasan, Ablation of polymers and biological tissue by ultraviolet lasers, *Science* **234**(4776), 559–565 (1986).
- [107] D. B. Wetlaufer, Ultraviolet spectra of proteins and amino acids, *Adv. Protein Chem.* **17**, 303–390 (1962).
- [108] G. Pettit, M. Ediger, Corneal-tissue absorption coefficients for 193- and 213-nm ultraviolet radiation, *Appl. Opt.* **35**(19), 3386–3391 (1996).
- [109] A. D. Yablon, N. S. Nishioka, B. B. Mikic, V. Venugopalan, Measurement of tissue absorption coefficients by use of interferometric photothermal spectroscopy, *Appl. Opt.* **38**(7), 1259–1272 (1999).
- [110] R. Srinivasan, B. Braren, R. Dreyfus, L. Hadel, D. Seeger, Mechanism of the ultraviolet laser ablation of polymethyl methacrylate at 193 and 248 nm: Laser-induced fluorescence analysis, chemical analysis, and doping studies, *J. Opt. Soc. Am. B* **3**(5), 785–791 (1986).
- [111] M. Braun, P. Gilch, W. Zinth, *Ultrashort Laser Pulses in Biology and Medicine* (Springer, Berlin Heidelberg, 2008).
- [112] P. Liu, W. L. Smith, H. Lotem, J. H. Bechtel, N. Bloembergen, R. S. Adhav, Absolute two-photon absorption coefficients at 355 and 266 nm, *Phys. Rev. B* **17**(12), 4620 (1978).
- [113] J. N. Chróinín, A. Dragomir, J. G. McInerney, D. N. Nikogosyan, Accurate determination of two-photon absorption coefficients in fused silica and crystalline quartz at 264 nm, *Opt. Commun.* **187**(1), 185–191 (2001).
- [114] A. Dragomir, J. G. McInerney, D. N. Nikogosyan, Femtosecond measurements of two-photon absorption coefficients at $\lambda=264$ nm in glasses, crystals, and liquids, *Appl. Opt.* **41**(21), 4365–4376 (2002).
- [115] S. A. Slattery, D. N. Nikogosyan, Two-photon absorption at 211 nm in fused silica, crystalline quartz and some alkali halides, *Opt. Commun.* **228**(1), 127–131 (2003).
- [116] S. Wu, G. A. Blake, S. Sun, H. Yu, Two-photon absorption inside β -BBO crystal during UV nonlinear optical conversion, *Proc. SPIE* **3928**, 221–227 (2000).
- [117] L. I. Isaenko, A. Dragomir, J. G. McInerney, D. N. Nikogosyan, Anisotropy of two-photon absorption in BBO at 264 nm, *Opt. Commun.* **198**(4), 433–438 (2001).

- [118] M. Divall, K. Osvay, G. Kurdi, E. Divall, J. Klebniczki, J. Bohus, Á. Péter, K. Polgár, Two-photon-absorption of frequency converter crystals at 248 nm, *Appl. Phys. B* **81**(8), 1123–1126 (2005).
- [119] W. Chen, A. Jiang, G. Wang, Growth of high-quality and large-sized β -BaB₂O₄ crystal, *J. Cryst. Growth* **256**(3-4), 383–386 (2003).
- [120] D. Perlov, S. Livneh, P. Czechowicz, A. Goldgirsh, D. Loiacono, Progress in growth of large β -BaB₂O₄ single crystals, *Cryst. Res. Technol.* **46**(7), 651–654 (2011).
- [121] R. W. Byren, D. S. Sumida, U.S. Patent 6,330,256 (2001).
- [122] D. N. Nikogosyan, *Nonlinear Optical Crystals: A Complete Survey* (Springer, New York, 2005).
- [123] I. H. van Stokkum, D. S. Larsen, R. van Grondelle, Global and target analysis of time-resolved spectra, *Biochim. Biophys. Acta* **1657**(2-3), 82–104 (2004).
- [124] R. L. Sutherland, *Handbook of Nonlinear Optics* (CRC press, Boca Raton, 2003).
- [125] J. C. Lagarias, J. A. Reeds, M. H. Wright, P. E. Wright, Convergence properties of the Nelder–Mead simplex method in low dimensions, *SIAM J. Optim.* **9**(1), 112–147 (1998).
- [126] M. Barkauskas, A. Melninkaitis, D. Mikšys, L. Meslinaitė, R. Grigonis, V. Sirutkaitis, H. Bercegol, L. Lamaignère, Characterization of KDP crystals used in large aperture doublers and triplers, *Proc. SPIE* **6403**, 64031V (2007).
- [127] M. M. Chirila, N. Y. Garces, L. E. Halliburton, S. G. Demos, T. A. Land, H. B. Radousky, Production and thermal decay of radiation-induced point defects in KD₂PO₄ crystals, *J. Appl. Phys.* **94**(10), 6456–6462 (2003).
- [128] J. E. Davis, R. S. Hughes, H. W. Lee, Investigation of optically generated transient electronic defects and protonic transport in hydrogen-bonded molecular solids. isomorphs of potassium dihydrogen phosphate, *Chem. Phys. Lett.* **207**(4), 540–545 (1993).
- [129] C. D. Marshall, S. A. Payne, M. A. Henesian, J. A. Speth, H. T. Powell, Ultraviolet-induced transient absorption in potassium dihydrogen phosphate and its influence on frequency conversion, *J. Opt. Soc. Am. B* **11**(5), 774–785 (1994).

- [130] S. Waheed, R. R. Krueger, Update on customized excimer ablations: recent developments reported in 2002, *Curr. Opin. Ophthalmol.* **14**(4), 198–202 (2003).
- [131] M. Mrochen, U. Schelling, C. Wuellner, C. Donitzky, Effect of time sequences in scanning algorithms on the surface temperature during corneal laser surgery with high-repetition-rate excimer laser, *J. Cataract Refract. Surg.* **35**(4), 738–746 (2009).
- [132] U. Brunsmann, U. Sauer, K. Dressler, N. Triefenbach, S. A. Mosquera, Minimisation of the thermal load of the ablation in high-speed laser corneal refractive surgery: The ‘intelligent thermal effect control’ of the AMARIS platform, *J. Mod. Opt.* **57**(6), 466–479 (2010).
- [133] U. Brunsmann, U. Sauer, S. Arba-Mosquera, T. Magnago, N. Triefenbach, Evaluation of thermal load during laser corneal refractive surgery using infrared thermography, *Infrared Phys. Techn.* **53**(5), 342–347 (2010).
- [134] S. A. Mosquera, U. Sauer, U. Brunsmann, *In vivo* measurements of thermal load during ablation in high-speed laser corneal refractive surgery, *J. Refract. Surg.* **28**(1) (2012).
- [135] M. Kohlhaas, Effect of central corneal thickness, corneal curvature, and axial length on applanation tonometry, *Arch. Ophthalmol.* **124**(4), 471 (2006).
- [136] D. Huang, M. Arif, Spot size and quality of scanning laser correction of higher-order wavefront aberrations, *J. Cataract Refract. Surg.* **28**(3), 407–416 (2002).
- [137] J. H. Shen, K. M. Joos, F. Manns, Q. Ren, F. Fankhauser, D. Denham, P. G. Soderberg, J.-M. Parel, Ablation rate of PMMA and human cornea with a frequency-quintupled Nd:YAG laser (213 nm), *Lasers Surg. Med.* **21**(2), 179–185 (1997).
- [138] G. Pettit, M. Ediger, R. Weiblinger, Dynamic optical properties of collagen-based tissue during ArF excimer laser ablation, *Appl. Opt.* **32**(4), 488–493 (1993).
- [139] S. Küper, M. Stuke, Femtosecond UV excimer laser ablation, *Appl. Phys. B* **44**(4), 199–204 (1987).
- [140] D. K. Cohen, B. Little, F. S. Luecke, Techniques for measuring 1- μ m diam gaussian beams, *Appl. Opt.* **23**(4), 637–640 (1984).

- [141] M. Campos, X. W. Wang, L. Hertzog, M. Lee, T. Clapham, S. L. Trokel, P. J. McDonnell, Ablation rates and surface ultrastructure of 193 nm excimer laser keratectomies, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **34**(8), 2493–2500 (1993).
- [142] X.-H. Hu, T. Juhasz, Study of corneal ablation with picosecond laser pulses at 211 nm and 263 nm, *Lasers Surg. Med.* **18**(4), 373–380 (1996).
- [143] G. T. Dair, W. S. Pelouch, P. P. van Saarloos, D. J. Lloyd, S. M. P. Linares, F. Reinholz, Investigation of corneal ablation efficiency using ultraviolet 213-nm solid state laser pulses, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**(11), 2752–2756 (1999).
- [144] R. Krueger, S. Trokel, H. Schubert, Interaction of ultraviolet laser light with the cornea, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **26**(11), 1455–1464 (1985).
- [145] M. W. Berns, L. Chao, A. W. Giebel, L.-H. Liaw, J. Andrews, B. VerS-teeg, Human corneal ablation threshold using the 193-nm ArF excimer laser, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 826–830 (1999).
- [146] M. S. Kitai, V. L. Popkov, V. Semchischen, A. A. Kharizov, The physics of UV laser cornea ablation, *Quantum Electron.* **27**(2), 302–307 (1991).
- [147] M. Vengris, E. Gabryte, A. Aleknavicius, M. Barkauskas, O. Rukse-nas, A. Vaiceliunaite, R. Danielius, Corneal shaping and ablation of transparent media by femtosecond pulses in deep ultraviolet range, *J. Cataract Refract. Surg.* **36**(9), 1579–1587 (2010).
- [148] F. E. Fantes, K. D. Hanna, G. O. Waring, Y. Pouliquen, K. P. Thomp-son, M. Savoldelli, Wound healing after excimer laser keratomileusis (photorefractive keratectomy) in monkeys, *Arch. Ophthalmol.* **108**(5), 665–675 (1990).
- [149] K. M. Meek, Corneal collagen—its role in maintaining corneal shape and transparency, *Biophys Rev* **1**(2), 83–93 (2009).
- [150] J. Goodfellow, G. Elliott, A. Woolgar, X-ray diffraction studies of the corneal stroma, *J. Mol. Biol.* **119**(2), 237–252 (1978).
- [151] G. Elliot, Z. Sayers, P. Timmins, Neutron diffraction studies of the corneal stroma, *J. Mol. Biol.* **155**(3), 389–393 (1982).

- [152] K. Meek, N. Fullwood, P. Cooke, G. Elliott, D. Maurice, A. Quantock, R. Wall, C. Worthington, Synchrotron X-ray diffraction studies of the cornea, with implications for stromal hydration, *Biophys. J.* **60**(2), 467 (1991).
- [153] A. Kanai, H. Kaufman, Electron microscopic studies of swollen corneal stroma, *Ann. Ophthalmol.* **5**(2), 178–190 (1973).
- [154] C. R. Fields, S. M. Taylor, F. M. Barker, Effect of corneal edema upon the smoothness of excimer laser ablation., *Optom. Vis. Sci.* **71**(2), 109–114 (1994).
- [155] P. J. Dougherty, K. L. Wellish, R. K. Maloney, Excimer laser ablation rate and corneal hydration, *Am. J. Ophthalmol.* **118**(2), 169–176 (1994).
- [156] W.-S. Kim, J.-M. Jo, Corneal hydration affects ablation during laser *in situ* keratomileusis surgery, *Cornea* **20**(4), 394–397 (2001).
- [157] M. H. Feltham, F. Stapleton, The effect of water content on the 193 nm excimer laser ablation, *Clin. Experiment. Ophthalmol.* **30**(2), 99–103 (2002).
- [158] B. A. Weber, L. Gan, P. Fagerholm, Wound healing response in the presence of stromal irregularities after excimer laser treatment, *Acta Ophthalmol. Scand.* **79**(4), 381–388 (2001).
- [159] C. B. O'Donnell, J. Kemner, F. E. O'Donnell Jr, Surface roughness in PMMA is linearly related to the amount of excimer laser ablation, *J. Refract. Surg.* **12**(1), 171 (1996).
- [160] S. M. Taylor, C. R. Fields, F. M. Barker, J. Sanzo, Effect of depth upon the smoothness of excimer laser corneal ablation, *Optom. Vis. Sci.* **71**(2), 104–108 (1994).
- [161] T. Bende, T. Seiler, J. Wollensak, Side effects in excimer corneal surgery, *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **226**(3), 277–280 (1988).
- [162] Y. Kitazawa, T. Tokoro, S. Ito, Y. Ishii, The efficacy of cooling on excimer laser photorefractive keratectomy in the rabbit eye, *Surv. Ophthalmol.* **42**, S82–S88 (1997).
- [163] Y. Kitazawa, E. Maekawa, S. Sasaki, T. Tokoro, M. Mochizuki, S. Ito, Cooling effect on excimer laser photorefractive keratectomy, *J. Cataract Refract. Surg.* **25**(10), 1349–1355 (1999).

- [164] J. M. Kim, J. C. Kim, W. C. Park, J.-S. Seo, H. R. Chang, Effect of thermal preconditioning before excimer laser photoablation, *J. Korean Med. Sci.* **19**(3), 437–446 (2004).
- [165] B. Masters, Three-dimensional confocal microscopy of the living *in situ* rabbit cornea, *Opt. Express* **3**(9), 351–355 (1998).
- [166] H. F. Li, W. M. Petroll, T. Møller-Pedersen, J. K. Maurer, H. D. Cavanagh, J. V. Jester, Epithelial and corneal thickness measurements by *in vivo* confocal microscopy through focusing (CMTF), *Curr. Eye Res.* **16**(3), 214–221 (1997).
- [167] B. J. Reiser, T. S. Ignacio, Y. Wang, M. Taban, J. M. Graff, P. Sweet, Z. Chen, R. S. Chuck, In vitro measurement of rabbit corneal epithelial thickness using ultrahigh resolution optical coherence tomography, *Vet. Ophthalmol.* **8**(2), 85–88 (2005).
- [168] W. M. Petroll, M. Weaver, S. Vaidya, J. P. McCulley, H. D. Cavanagh, Quantitative 3-dimensional corneal imaging *in vivo* using a modified HRT-RCM confocal microscope, *Cornea* **32**(4), e36–e43 (2013).
- [169] S. Tuft, R. Al-Dhahir, P. Dyer, Z. Zhu, Characterization of the fluorescence spectra produced by excimer laser irradiation of the cornea, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **31**(8), 1512–1518 (1990).
- [170] D. Cohen, R. Chuck, G. Bearman, P. McDonnell, W. Grundfest, Ablation spectra of the human cornea, *J. Biomed. Opt.* **6**(3), 339–343 (2001).
- [171] S. Adib-Moghaddam, S. Arba-Mosquera, B. Salmanian, A.-H. Omidvari, F. Noorizadeh, On-line pachymetry outcome of ablation in aberration free mode TransPRK, *Eur. J. Ophthalmol.* **24**(4 (July-August 2014)), 483–489 (2014).
- [172] H.-J. Huebscher, U. Genth, T. Seiler, Determination of excimer laser ablation rate of the human cornea using *in vivo* Scheimpflug videography, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **37**(1), 42–46 (1996).
- [173] J. C. Erie, Corneal wound healing after photorefractive keratectomy: a 3-year confocal microscopy study, *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **101**, 293 (2003).
- [174] A. Ivarsen, W. Fledelius, J. Ø. Hjortdal, Three-year changes in epithelial and stromal thickness after PRK or LASIK for high myopia, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**(5), 2061 (2009).

- [175] <https://www.myalcon.com>, tikrinta 2015-06-14.
- [176] T. Oshika, S. D. Myce, M. K. Smolek, M. B. McDonald, Corneal hydration and central islands after excimer laser photorefractive keratectomy, *J. Cataract Refract. Surg.* **24**(12), 1575–1580 (1998).
- [177] B. T. Fisher, K. A. Masiello, M. H. Goldstein, D. W. Hahn, Assessment of transient changes in corneal hydration using confocal Raman spectroscopy, *Cornea* **22**(4), 363–370 (2003).
- [178] F. Amparo, S. Patel, J. L. Alió, J. L. Rodriguez-Prats, L. J. Moreno, Relationship between patient age and refractive index of the corneal stroma during refractive surgery assisted by femtosecond laser flap creation, *Cornea* **31**(7), 751–755 (2012).
- [179] G. T. Dair, R. A. Ashman, R. H. Eikelboom, F. Reinholz, P. P. van Saarloos, Absorption of 193- and 213-nm laser wavelengths in sodium chloride solution and balanced salt solution, *Arch. Ophthalmol.* **119**(4), 533–537 (2001).
- [180] H. Misawa, S. Juodkazis, *3D laser microfabrication: Principles and applications* (Wiley-VCH, Weinheim, 2006).
- [181] R. W. Waynant, *Lasers in Medicine* (CRC press, Boca Raton, 2001).
- [182] A. R. Collins, The comet assay for DNA damage and repair, *Mol. Biotechnol.* **26**(3), 249–261 (2004).
- [183] V. Morkunas, O. Ruksenas, M. Vengris, E. Gabryte, E. Danieliene, R. Danielius, DNA damage in bone marrow cells induced by ultraviolet femtosecond laser irradiation, *Photomed. Laser Surg.* **29**(4), 239–244 (2011).
- [184] W. Strober, Trypan blue exclusion test of cell viability, *Curr. Protoc. Immunol.* A.3B (2001).
- [185] R. C. Nuss, C. A. Puliafito, E. Dehm, Unscheduled DNA synthesis following excimer laser ablation of the cornea *in vivo*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **28**(2), 287–294 (1987).
- [186] C. K. M. Choy, I. F. F. Benzie, P. Cho, UV-mediated DNA strand breaks in corneal epithelial cells assessed using the comet assay procedure, *Photochem. Photobiol.* **81**(3), 493–497 (2005).
- [187] K. D. Solomon, E. Donnenfeld, H. P. Sandoval, O. Al Sarraf, T. J. Kasper, M. P. Holzer, E. H. Slate, D. T. Vroman, F. T. S. Group, et al.,

- Flap thickness accuracy: Comparison of 6 microkeratome models, J. Cataract Refract. Surg. **30**(5), 964–977 (2004).
- [188] Ö. Ö. Uçakhan, Corneal flap thickness in laser *in situ* keratomileusis using the summit krumeich-barraquer microkeratome, J. Cataract Refract. Surg. **28**(5), 798–804 (2002).
- [189] M. P. Holzer, T. M. Rabsilber, G. U. Auffarth, Femtosecond laser-assisted corneal flap cuts: Morphology, accuracy, and histopathology, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **47**(7), 2828–2831 (2006).
- [190] A. Issa, U. Al Hassany, Femtosecond laser flap parameters and visual outcomes in laser *in situ* keratomileusis, J. Cataract Refract. Surg. **37**(4), 665–674 (2011).
- [191] J. Pepose, H. Lubatschowski, Comparing femtosecond lasers, Cataract Refract. Surg. Today **10**, 45–52 (2008).
- [192] A. Ivarsen, S. Asp, J. Hjortdal, Safety and complications of more than 1500 small-incision lenticule extraction procedures, Ophthalmology **121**(4), 822–828 (2014).
- [193] M. Moshirfar, M. V. McCaughey, D. Z. Reinstein, R. Shah, L. Santiago-Caban, C. R. Fenzl, Small-incision lenticule extraction, J. Cataract Refract. Surg. **41**(3), 652–665 (2015).

Padėka

Nuoširdžiai dėkoju visiems mūsų mokslinės grupės nariams, prisidėjusiems prie šioje disertacijoje pristatomų tyrimų. Labai džiaugiuosi, kad studijų metu turėjau netgi du labai nuostabius mokslinius vadovus – dr. Miką Vengrį ir dr. Romualdą Danielių. Noriu jiems padėkoti už visakeriopą pagalbą, suteiktas žinias bei kantrybę. Nuoširdžiai dėkoju oftalmologei dr. Eglei Danielienei už bendradarbiavimą atliekant *in vivo* tyrimus. Noriu tik pasidžiaugti, kad prieš keletą metų Romas su Egle užkūrė visą šioje disertacijoje aprašomų (ir toli gražu dar nesibaigiančių) tyrimų katilą – jiems kilo idėja lietuvišką femtosekundinį lazerį pritaikyti oftalmologijai.

Noriu padėkoti prof. Osvaldui Rukšėnui ir dr. Agnei Vaičeliūnaitei už pagalbą atliekant *in vivo* tyrimus; dr. Vaidotui Morkūnui ir Gintarei Urbonaitei už bendradarbiavimą atliekant genotoksiškumo tyrimus; Vilniaus universiteto vivariumo darbuotojoms už rūpinimąsi laboratoriniais gyvūnais; Simui Sobutui ir dr. Aidui Aleknavičiui prisidėjusiems prie fizikinės eksperimentinės darbo dalies; Algirdui Gutauskui už ArF lazerine sistema atliktas operacija ir visiems kitiems čia nepaminėtiems.

Už mokslinę bei moralinę pagalbą, konsultacijas rašybos klausimais, techninę darbų priežiūrą bei kulinarinį palaikymą kūrybinių kančių metu baisiausiai dėkoju Vytautui Butkui.

Ačiū visiems, kurie mane palaikė – tėvams, draugams ir visam UAB MGF „Šviesos konversija“ kolektyvui.

Taip pat dėkoju UAB „Cesta“ už geranorišką mokslo paramą.

Šiame darbe pristatyti tyrimai buvo iš dalies finansuoti Lietuvos Valstybinio mokslo ir studijų fondo (dotacijos nr. B-07008). Taip pat dėkoju už Lietuvos mokslo tarybos projekto „Studentų mokslinės veiklos skatinimas“ (VP1-3.1-ŠMM-01-V-02-003) paramą (projektas finansuojamas pagal Žmoniškųjų išteklių plėtros veiksmų programos 3 prioritetą „Tyrejų gebėjimų stiprinimas“ iš Europos socialinio fondo ir Lietuvos Respublikos valstybės biudžeto lėšų).