

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Eglė

— DANIELIENĖ —

RAGENOS ABLIACIJA
FEMTOSEKUNDINIAIS
ULTRAVIOLETINIAIS
IMPULSAIS

—
D A K T A R O D I S E R T A C I J A
—

BIOMEDICINOS MOKSLAI, MEDICINA (06 B)

Vilnius, 2015

Disertacija ginama eksternu.

Moksliniai konsultantai:

Prof. dr. Janina Tutkuvienė (Vilniaus universitetas,
biomedicinos mokslai, medicina – 06 B)

Prof. dr. Osvaldas Rukšėnas (Vilniaus universitetas,
biomedicinos mokslai, biofizika– 02 B)

Lietuvių kalbos redaktorė Jolanta Storpirstienė

TURINYS

SANTRUMPOS	7
1. ĮVADAS.....	9
1.1. Darbo tikslas ir uždaviniai	12
1.2. Ginamieji teiginiai	13
1.3. Mokslinio darbo naujumas	13
1.4. Praktinė darbo reikšmė	14
1.5. Autorės ir bendraautorių indėlis	15
2. LITERATŪROS APŽVALGA	16
2.1. Triušio kaip eksperimentinio gyvūno ragenos ypatumai	16
2.2. Keratorefrakcinės chirurgijos metodų apžvalga	17
2.2.1. Incizinės keratotomijos	18
2.2.2. Paviršinės abliacijos lazeriu: FRK, LASEK, epi-LASEK ir epi-LASIK	19
2.2.3. Lamelinės procedūros: LASIK ir presbiLASIK	20
2.2.4. Ragenos implantai	22
2.2.5. Ragenos susitraukimo procedūros: lazerinė termokeratoplastika ir kondukcinė arba radijo dažnio keratoplastika	22
2.3. Fotoabliacija ir jai naudojamų lazerių apžvalga	22
2.4. Fotodisrupcija ir femtosekundiniai lazeriai oftalmologijoje.....	26
2.4.1. Femtosekundinių lazerių taikymo oftalmologijoje ypatumai	26
2.4.2. Femtosekundiniai lazeriai keratorefrakcinėje chirurgijoje	30
2.4.2.1. Ragenos LASIK lopelio formavimas femtosekundiniu lazeriu	30
2.4.2.2. Intrastrominė refrakcinė lentikulo ekstrakcija	33
2.4.2.3. Intrastrominė presbiopijos korekcija (INTRACOR)	34
2.4.2.4. Kiti femtosekundinio lazerio taikymai keratorefrakcinėje chirurgijoje	35

2.4.3. Femtosekundiniai lazeriai keratoplastikoje	36
2.4.4. Femtosekundiniai lazeriai kataraktos chirurgijoje	37
2.5. Abliacijos greitis ir LASIK operacijos trukmė. Transepitelinė fotorefrakcinė keratektomija	38
2.6. Ragenos žaizdų gijimas po paviršinės abliacijos ir LASIK bei subepitelinę miglą įtakojantys veiksniai	41
2.7. Mitomicinas C ir jo panaudojimas keratorefrakcinėje chirurgijoje	45
3. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI	48
3.1. Pirmoji eksperimentų serija. Triušio ragenos abliacijos femtosekundiniais UV impulsais operacijos ir baigčių vertinimo protokolo parengimas	48
3.2. Antroji eksperimentų serija. Fotorefrakcinės keratektomijos femtosekundiniais ultravioletiniais impulsais eigos ir gijimo baigčių įvertinimas. Palyginimas su fotorefrakcine keratektomija nanosekundiniais ultravioletiniais eksimerinio lazerio impulsais	50
3.2.1. Lazerinė sistema	50
3.2.2. Operacijos aprašymas	51
3.2.3. Pooperacinis stebėjimas ir subepitelinės miglos matavimai	54
3.2.4. Histologiniai tyrimai	55
3.2.5. Statistinė duomenų analizė	56
3.3. Trečioji eksperimentų serija. Transepitelinė abliacija optimizuotais didesnės vidutinės galios femtosekundiniais ultravioletiniais impulsais. Palyginimas su abliacija nanosekundiniais ultravioletiniais eksimerinio lazerio impulsais	56
3.3.1. Femtosekundinė lazerinė sistema	56
3.3.2. Procedūros	58
3.3.2.1. Abliacijos našumo kalibracija	58
3.3.2.2. Nepertraukiama TransFRK femtosekundiniais UV impulsais	59
3.3.2.3. Transepitelinė abliacija nanosekundiniais eksimeriniais UV impulsais	59
3.3.2.4. Modifikuota TransFRK femtosekundiniais UV impulsais	60

3.3.3. Pooperacinis stebėjimas	61
3.3.4. Histologiniai tyrimai	62
4. DARBO REZULTATAI	63
4.1. Pirmosios eksperimentų serijos rezultatai	63
4.2. Antrosios eksperimentų serijos rezultatai	66
4.2.1. Abliacijos našumo kalibracija	66
4.2.2. Abliacijos trukmė	67
4.2.3. Dėmės dydžio ir impulsų pasikartojimo dažnio pasirinkimas	67
4.2.4. Ragenos paviršiaus temperatūra	68
4.2.5. Plyšio pavidalo abliacija	69
4.2.6. Ragenų subepitelinės miglos įvertinimas, histologiniai tyrimai ir transmisinė elektroninė mikroskopija	71
4.2.7. Eksperimentai kai kurių veiksnių įtakai gijimui iširti	79
4.2.7.1. Abliuoto paviršiaus lygumo įtaka gijimui	79
4.2.7.2. Stomos brinkinimo įtaka abliacijos eigai ir gijimui	81
4.2.7.3. Abliacija su MMC	83
4.3. Trečiosios eksperimentų serijos rezultatai	84
4.3.1. Abliacijos gylis ir ragenos centrinės dalies storio kitimas	84
4.3.2. Abliacijos greitis	87
4.3.3. Ragenos paviršiaus temperatūra	88
4.3.4. Subepitelinės miglos įvertinimas	89
5. REZULTATŲ APTARIMAS	92
5.1. Abliacijos femtosekundiniais ultravioletiniais impulsais efektyvumas triušio ragenoje <i>in vivo</i>	93
5.2. Miopinės abliacijos femtosekundiniais ultravioletiniais impulsais ir nanosekundiniais ultravioletiniais eksimerinio lazerio impulsais palyginimas	94
5.2.1. Audinių hidracija ir džiuvimas	94
5.2.2. Paviršiaus temperatūros kitimas	95
5.2.3. Stomos paviršiaus lygumas po abliacijos	97

5.3. Abliacijos femtosekundiniais ultravioletiniais impulsais greitis. Miopinės transepitelinės fotorefrakcinės keratektomijos ypatumai.....	99
5.4. Ragenos gijimo procesas ir jo baigtys po abliacijos femtosekundiniais ultravioletiniais impulsais ir nanosekundiniais ultravioletiniais eksimerinio lazerio impulsais	102
6. IŠVADOS	105
7. LITERATŪROS SĄRAŠAS	106
8. PUBLIKACIJŲ IR PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS	129
PADĖKA	132

SANTRUMPOS

ArF	—	argono fluoridas
AK	—	astigmatinė keratotomija
D	—	dioptrijs
DNR	—	dezoksiribonukleorūgštis
FLEx	—	femtosekundinė lentikulo ekstrakcija
FRK	—	fotorefracinė keratektomija
Fs	—	femtosekundė (10^{-15} s)
FTK	—	fototerapinė keratektomija
HE	—	hematoksilinas ir eozinas
Hz	—	hercas
IL	—	interleukinai
IR	—	infraraudonoji (spinduliuotė)
J	—	džaulis
JAV	—	Jungtinės Amerikos Valstijos
Yb:KGW	—	iterbiu legiruotas kalio gadolinio volframatas
kHz	—	kilohercas (10^3 Hz)
LASEK	—	lazerinė subepitelinė keratomilezė
LASIK	—	lazerinė <i>in situ</i> keratomilezė
MHz	—	megahercas (10^6 Hz)
MMC	—	mitomicinas C
mJ	—	milidžaulis (10^{-3} J)
ms	—	milisekundė (10^{-3} s)
Nd:YAG	—	neodimiu legiruotas itrio aliuminio granatas
nJ	—	nanodžaulis (10^{-9} J)
nm	—	nanometras (10^{-9} m)
ns	—	nanosekundė (10^{-9} s)
OKT	—	optinė koherentinė tomografija
pL	—	pikolitrų (10^{-12} litro)
PLK	—	priekinė lamelinė keratoplastika
PresbiLASIK	—	presbiopinė lazerinė <i>in situ</i> keratomilezė
RCS	—	ragenos centrinės dalies storis

ReLEx	—	refrakcinė lentikulo ekstrakcija
RK	—	radialinė keratotomija
SBT	—	subalansuotas druskų tirpalas
SEM	—	skenuojamoji elektroninė mikroskopija
SN	—	standartinė nuokrypa
TransFRK	—	transepitelinė fotorefrakcinė keratektomija
TEM	—	transmisinė elektroninė mikroskopija
UV	—	ultravioletinė (spinduliuotė)
μm	—	mikrometras (10^{-6} m)
W	—	vat

1. ĮVADAS

Akies refrakcijos ydas galima koreguoti akiniais, kontaktiniais lęšiais ir chirurginiu būdu. Vertinant šiuos tris korekcijos būdus pagal pacientų gyvenimo kokybę, refrakcinė chirurginė korekcija teikia daugiausia pasitenkinimo, o akiniai – mažiausia (Pesudovs, Garamendi et al. 2006). Refrakcinės chirurginės procedūros skirstomos į lęšiuko chirurgiją (intraokulinių lęšių implantavimas) ir keratorefrakcinę (ragenos) chirurgiją. Keratorefrakcinės chirurgijos tikslas yra pakeisti ragenos laužiamąją gebą taip, kad neberekėtų nešioti akinių. Beveik visada operuojami darbingo amžiaus žmonės su sveikomis ragenomis, todėl ypač svarbu, kad operacija būtų saugi, o rezultatai prognozuojami bei ilgalaikiai.

Dažniausia refrakcinė operacija pasaulyje yra lazerinė *in situ* keratomilezė (LASIK) (Duffey and Leaming 2005; Reinstein, Archer et al. 2012). Ši operacija žmonėms pirmą kartą buvo atlikta 1992 metais (Buratto ir Ferrari 1992). Solomono (Solomon, Fernandez de Castro et al 2009) apžvalga rodo, kad rezultatais patenkinti 95,4% pacientų. Po šių operacijų sėkmingai dirba JAV Jūrų karinio laivyno lakūnai, iš kurių net 99,6% rekomenduotų šį gydymą kitiems (Tanzer, Brunstetter et al. 2013).

LASIK operacija atliekama dviem etapais. Pirmuoju etapu atpjaunamas ir pakeliamas ragenos lopelis, o antruoju – abliuojama rageną, t.y. formuojamas naujas reikiamo gaubtumo paviršius (Pallikaris, Papatzanaki et al 1990). Lopelį užklojus ir ragenai sugijus, pasikeičia ragenos laužiamoji geba, ir taip galima pakoreguoti trumparegystę, toliaregystę ir astigmatizmą.

Ragenos lopeliui atidalyti naudojamas mikrokeratomas (mechaninis peiliukas) arba femtosekundinis lazeris, veikiantis artimajame infraraudonajame (IR) diapazone (bangos ilgis ~1000 nm). Rageną yra pralaidi šioms IR spinduliams, todėl femtosekundinės (femtosekundė – 10^{-15} s) trukmės impulsus galima sufokusuoti pagedaujamame gylyje, kur įvyksta fotodisrupcija, o gretimi audiniai lieka nepažeisti. Operacija, kai lopelis atidalijamas femtosekundiniu lazeriu, o stroma abliuojama nanosekundiniu lazeriu, vadinama femto-LASIK (Ghoreishi, Naderi Beni et al. 2013). Lopeliui atidalyti vietoj mechaninio atplovimo mikrokeratomu vis dažniau naudojamas femtosekundinis lazeris, nes tyrimai įrodė tokius jo pranašumus kaip didesnis saugumas ir tikslumas, spartesnis regėjimo atgavimas (Binder 2004; von Jagow ir Kohnen 2009; Murakami ir Manche 2011), tikslesnės korekcijos baigtys (Tanna, Schallhorn et al. 2009). Atkėlus lopelį, nanosekundiniu ultravioletinės (UV) spindu-

liuotės lazeriu (bangos ilgis ~200 nm) atliekama stromos fotoabliacija, t. y. pašalinami paviršiniai audiniai. Šiuos spindulius ragenos paviršius labai gerai sugeria (Lembares, Hu et al. 1997), jie giliau neprasiskverbia, todėl abliacija efektyvi ir prognozuojama. Fotoabliacijai dažniausiai naudojamas eksimerinis argono fluorido (ArF) lazeris, generuojantis kelių nanosekundžių trukmės 193 nm bangos ilgio impulsus. Šiam nuodingų ArF dujų lazeriui reikia gana sudėtingos priežiūros, tinkamo mikroklimato.

Vietoje eksimerinių gali būti naudojami kietojo kūno nanosekundiniai UV lazeriai (Tsiklis, Kymionis et al. 2007; Roszkowska, Korn et al. 2004). Tai neodimio jonų pagrindu veikiančys lazeriai, kurių penktosios harmonikos spinduliuotė (206–215 nm) yra tinkama abliacijai (Ren, Gailitis et al. 1990; Anderson, Sanders et al. 2004; Roszkowska, Korn et al. 2004). Šie lazeriai neturi dujinių lazerių trūkumų, tačiau jais kol kas atliekama tik stromos abliacija. Chirurgo praktikoje būtų patogu ir pigiau kainuotų, jei abu LASIK etapus būtų galima atlikti vienu kietojo kūno prietaisu (Kittelman, Korn et al. 2010; Kittelman, Korn et al. 2012). „Katana“ 2014 metais paskelbė apie ketinimą gaminti naują prietaisą (<http://www.katanalaser.com>). Šis lazerinis prietaisas, vadinamas „LaserSoft Dual“, yra titano safyro kietojo kūno lazerio pagrindu sukurta sistema, kur skirtingomis harmonikomis bus išgaunama ir IR, ir UV spinduliuotė. „Katana“ skelbia, kad šiuo lazeriu bus galima atlikti ragenos abliaciją, mikrokeratomo funkcijas, sluoksninę ir kiaurinę keratoplastikas bei kataraktos chirurgiją, suformuoti ragenos kišenes. Šis prietaisas pagal funkcijas yra analogiškas mūsų kuriamajam, tačiau mes pirmieji paskelbėme apie abliaciją femtosekundiniais UV impulsais ir viso LASIK proceso atlikimą vienu lazeriu *in vivo* (Gabrytė, Danieliene et al. 2013).

Femtosekundiniu lazeriu, veikiančiu artimajame IR diapazone, galima labai tiksliai atidalyti ragenos audinius, todėl jis naudojamas ne tik lopeliui atpjauti, bet ir ragenos chirurgijoje audiniams atpjauti, atliekant sluoksninę ir kiaurinę keratoplastikas (Farid, Kim et al. 2007; Por, Cheng et al. 2008); astigmatinei keratotomijai (Abbey, Ide et al. 2009; Hoffart, Proust et al. 2009; Nubile, Carpineto et al. 2009); tunelio pavidalo pjūviams, kurie reikalingi intrastrominių žiedų segmentams įsodinti (Pinero, Alio et al. 2009). Prieš keletą metų fotodisrupcija femtosekundiniu lazeriu pradėta taikyti ir kataraktos chirurgijoje kapsuloreksiui (Nagy, Takacs et al. 2009) ir lęšiuko branduolio suskaldymui (Nagy, Takacs et al. 2009; Friedman, Palanker et al. 2011; Tackman, Kuri et al. 2011). Šioms procedūroms pakanka nedidelės galios lazerio. Kai kurios femtosekundinės lazerinės sistemos, pavyzdžiui, „Victus Technolas PerfectVision“ (Bausch and Lomb) (<http://www.bausch.com>) turi leidimus atlikti kelias funkcijas: atida-

lyti lopelį, atlikti astigmatinius pjūvius ir kapsuloreksiją bei suskaldyti lęšiuko branduolį.

Vienas naujesnių femtosekundinio lazerio pritaikymų yra refrakcinė lentikulo ekstrakcija (angl. *refractive lenticule extraction* – ReLEx) (Sekundo, Kunert et al. 2008; Shah ir Shah 2011), kai ragenos stromoje suformuojamas reikiamos formos lentikulas (angl. *lenticule*), kurį pašalinus pasikeičia ragenos laužiamoji geba. Nors ir turi privalumų, tačiau šis metodas kol kas negali visiškai pakeisti LASIK ir fotorefrakcinės keratektomijos (FRK). Blum ir kt. (Blum, Kunert et al. 2013) paskelbė pirmuosius toliaregystės korekcijos rezultatus, kurie rodo, kad procedūra turi mažai šalutinių poveikių, tačiau yra nestabili ir nepakankamai prognozuojama. Paskelbta, kad šiuo metodu nebuvo visiškai pašalintas astigmatizmas (Ivarsen ir Hjortdal 2014). Be to, ReLEx netinka vadinamosioms pagerinimo procedūroms (reoperacijoms), kai pirmosios operacijos metu nepavyksta pasiekti tinkamos refrakcijos arba išsivysto komplikacijų.

Pastaraisiais metais pramonėje, ypač mikroelektronikoje, naudojami galingi, stabilūs, kompaktiški, moduluojami kietojo kūno femtosekundiniai lazeriai (Raciukaitis, Grishin et al. 2006). Lazerinė sistema „Pharos“, sukurta UAB „Šviesos konversija“ (<http://www.lightcon.com>), sėkmingai naudojama pramonėje nuo 2008 metų. Per kelias sekundes galima pakeisti šio lazerio pasikartojimo dažnį, galią bei energijos tankį, tokiu būdu pakeičiant lazerio funkcijas. Dirbant iki ~1 MHz pasikartojimo dažniu, kai bangos ilgis 1030 nm, galima gauti pakankamos energijos impulsus ragenos intrastrominei fotodisrupcijai, o sumažinus pasikartojimo dažnį iki 5–50 kilohercų (kHz) ir naudojant harmonikų generatorių, galima generuoti santykinai didelės energijos ~200 nm bangos ilgio UV impulsus, tinkamus fotoabliacijai. Tai leidžia vieną lazerinę sistemą panaudoti abiem LASIK etapams, t. y. visą operaciją atlikti vienu femtosekundiniu prietaisu, užuot naudojus du.

Ragenos stromos lopeliams atpjauti ir intrastrominiams iki 30 μm storio lentikulams formuoti lazerinis prietaisas „Pharos“ jau buvo sėkmingai panaudotas *ex vivo* kiaulių akyse (Miclea, Skrzypczak et al. 2011). Antrasis LASIK etapas, t. y. stromos abliacija, lazerio „Pharos“ prototipu su penktosios harmonikos generatoriumi buvo atliktas polimetilmetakrilate, želatinoje ir šviežiai enukleuotose kiaulės akyse (Vengris, Gabryte et al. 2010). Šiose medžiagose, formuojant miopinius ir hipermetropinius lęšius, abliacija buvo greita, tiksli ir prognozuojama. Gyvųjų audinių abliacijai iki šiol femtosekundiniai UV impulsai nebuvo naudojami, todėl buvo neaišku, kaip šie audiniai reaguotų į labai trumpus nepaprastai didelio intensyvumo ir mažo dėmės dydžio impulsus. Šiuo metu naudojamais nanosekundiniais la-

zeriais ragenos abliacija atliekama apie 10 ns trukmės impulsais, pluoštelio dėmės skersmuo yra 0,2–2 mm ir pasikartojimo dažnis iki ~1 kHz, o femtosekundinio UV impulso trukmė yra apie 300 fs, pluoštelio skersmuo – 100–280 nm, pasikartojimo dažnis 5–50 kHz. Abliuojant femtosekundiniais UV impulsais, jų intensyvumas yra ~10 000 kartų didesnis negu nanosekundinių.

Įvertinus gyvųjų audinių atsaką, būtų galima spręsti, ar įmanoma abliaciją femtosekundiniais UV impulsais taikyti klinikinėje praktikoje. Jei taip, tai vieną prietaisą – femtosekundinę kietojo kūno lazerinę sistemą su harmonikų generatoriais – chirurgas galėtų naudoti ne tik ragenos refrakcinėms operacijoms, bet ir kitoms femtosekundiniu lazeriu atliekamoms intervencijoms, kartu ir kataraktos chirurgijai.

Taigi, modernios femto-LASIK operacijos dviem etapams – fotodisrupcijai ir fotoabliacijai – naudojami du skirtingi lazeriai. Tai nėra patogu: pacientą arba lazerį operacijos metu reikia perkelti; be to, du lazeriniai prietaisai užima daug vietos ir brangiai kainuoja. Situacija iš esmės pasikeistų, jei abu etapus būtų galima atlikti naudojant vieną daugiavfunkcę femtosekundinę kietojo kūno sistemą.

1.1. Darbo tikslas ir uždaviniai

Tikslas

Optimizuoti ir charakterizuoti inovatyvų ragenų abliacijos kietojo kūno lazerio didelio pasikartojimo dažnio femtosekundiniais UV (bangos ilgis 206 nm) impulsais metodą *in vivo*.

Uždaviniai

1. Nustatyti femtosekundinių UV impulsų parametrus, tinkamus triušių ragenų abliacijai *in vivo*.
2. Palyginti miopinės abliacijos femtosekundiniais UV ir nanosekundiniais UV eksimerinio lazerio impulsais (bangos ilgis 193 nm) ypatybes: paviršiaus temperatūros kitimą ir paviršiaus audinių džiūvimą, stromos paviršiaus lygumą po procedūros.
3. Ištirti greitos abliacijos femtosekundiniais UV impulsais ypatumus, atliekant miopinę transepitelinę fotorefrakcinę keratektomiją (TransFRK).
4. Palyginti ragenos gijimo procesą ir jo baigtis po abliacijos femtosekundiniais UV impulsais ir nanosekundiniais UV eksimerinio lazerio impulsais, vertinant subepitelinės miglos vystymąsi ir laipsnį, histologinius pakitimus.

1.2. Ginamieji teiginiai

1. Ragenos abliacija femtosekundiniais UV impulsais yra efektyvi ir atkartojama, todėl femtosekundiniai kietojo kūno lazeriai refrakcinėje chirurgijoje galėtų pakeisti šiuo metu naudojamus nanosekundinius.
2. Abliacijos femtosekundiniais UV impulsais kokybė, palyginti su analogiška procedūra nanosekundiniais UV eksimeriniais impulsais, nėra blogesnė vertinant abliacijos atkartojamumą, stromos paviršiaus džiuvimą, paviršiaus kaitimą ir lygumą po procedūros.
3. Nors esama didelių impulsų intensyvumo ir pasikartojimo dažnio skirtumų, gijimas ir baigtys po abliacijos femtosekundiniais UV impulsais ir nanosekundiniais UV eksimerinio lazerio impulsais yra panašūs.

1.3. Mokslinio darbo naujumas

Šiame darbe pirmą kartą, mūsų žiniomis, *in vivo* ragenos abliacijai panaudoti femtosekundiniai didelio pasikartojimo dažnio ir mažo dėmės dydžio UV impulsai. Pirmą kartą femtosekundiniais UV impulsais *in vivo* buvo atliktos FRK ir miopinė TransFRK. Atliekant FRK, mechaniškai šalintino epitelio skersmuo buvo apibrėžiamas lazeriu.

Buvo išbandytas ir palygintas skirtingo pasikartojimo dažnio (20 ir 50 kHz), skirtingos galios (180 ir 200 mW) ir skirtingo dydžio dėmių (280 ir 130 μm) poveikis ragenos paviršiaus abliacijos kokybei bei gijimo baigtims. Padidinus UV spinduliuotės galią iki 400 mW ir pakeitus abliacijos profilį iš Gauso į supergausinį, buvo pasiektas abliacijos greitis, atitinkantis šiuolaikinių eksimerinių sistemų greitį. Svarbu, kad didelis greitis pasiektas tik tikslios abliacijos režimu, t. y. per visą procedūrą abliuojant dideliu greičiu mažo skersmens dėmėmis.

Pirmą kartą buvo stebimas gijimo procesas ir vertinamos gijimo baigtys po ragenos abliacijos femtosekundiniais UV impulsais. Buvo atliktos skirtingo gylio FRK (30 ir 130 μm), abliacija su mitomicinu C (MMC). Padidinus abliacijos greitį, buvo atlikta nepertraukiama TransFRK (110 μm) ir TransFRK su pauzėmis (150 μm). Siekiant palyginti naują abliacijos metodą su taikomais praktikoje, buvo atliekamos atitinkamo gylio FRK ir TransFRK procedūros nanosekundiniais UV komercinio eksimerinio lazerio impulsais, naudojant panašų energijos tankį. Buvo nustatyta, kad abliuojant femtosekundiniais UV impulsais gijimo baigtys nėra blogesnės, nei abliuojant nanosekundiniais UV eksimerinio lazerio impulsais.

1.4. Praktinė darbo reikšmė

Įrodžius, kad femtosekundiniais UV impulsais galima saugiai atlikti ragenos abliaciją, femtosekundinis lazeris galėtų pakeisti nanosekundinį ir viena lazerine sistema būtų galima atlikti abu LASIK etapus. Klinikinėje praktikoje įdiegta ši procedūra turėtų ne tik kietojo kūno lazeriui būdingų pranašumų, palyginti su dujiniu, tačiau ir dar kelis pranašumus prieš dabar naudojamas eksimerines sistemas:

- Dėl mažesnio dėmės dydžio didelio pasikartojimo dažnio impulsais galėtų būti formuojami ypač tikslūs abliacijos profiliai.
- 206 nm bangos ilgio UV impulsus mažiau sugeria vanduo ir subalansuotas druskų tirpalas (SBT) (Dair, Ashman 2001), todėl abliacija turėtų mažiau skirtis skirtingo hidracijos lygio ragenose. Dėl mažesnės sugerties vandenyje ne tokia svarbi tampa aplinkos drėgmė ir kartu operacinės mikroklimato reikalavimai.
- Vietoj mechaninio žymeklio deepitelizacijos plotą FRK operacijoms būtų galima apibrėžti lazeriu. Privalumai yra ne tik didesnis sterilumas, bet ir galimybė suprogramuoti pageidaujamo ir atkartojamo skersmens apskritimą bei norimo gylio (atitinkančio individo epitelio storį) įpjovą.
- Kai pasikartojimo dažnis didelis ir impulso energija maža, praktiškai nebelieka smūginių bangų, todėl abliacija yra negirdima. Begarsė operacija sukeltų mažiau streso tiek pacientui, tiek chirurgui.
- Integravimas padidintų operacijų saugumą, greitį ir patogumą, nes nebereikėtų nei perkelti paciento nuo vienos sistemos prie kitos, nei chirurgui keisti darbo vietas. Sutrumpėtų operacijos trukmė, o tai naudinga ir pacientui, ir chirurgui.
- Integruota universali sistema užimtų mažiau vietos operacinėje, leistų sumažinti instaliacijos ir priežiūros išlaidas.
- Chirurgui nereikėtų mokytis naujos operacijos technikos, nes būtų atliekami standartiniai LASIK etapai, tik reikėtų išmokti valdyti naują prietaisą. Šiuo prietaisu būtų galima atlikti ir standartines paviršinės abliacijos procedūras, įskaitant TransFRK su visomis jos modifikacijomis.
- Manome, kad tą patį daugiafunkcij prietaisą būtų galima panaudoti ir šiuo metu žinomoms femtosekundiniu lazeriu atliekamoms procedūroms, pavyzdžiui, ReLEx, lęšiuko kapsulės discizijai, branduolio fragmentacijai, įvairiai keratoplastikai, astigmatiniams pjūviams, intrastrominei presbiopijos korekcijai ir kitoms.

1.5. Autorės ir bendraautorių indėlis

Darbą atliko tyrėjų grupė, kurią sudarė fizikai lazerininkai, biologai ir oftalmologė (disertantė). Disertantė iš esmės prisidėjo kuriant darbo metodiką. Ji sudarė operacijos protokolą, rengė laboratorinius gyvūnus operacijoms, kontroliavo operacijų eigą ir stebėjo bei vertino gyvūnų gijimą po operacijų bei interpretavo rezultatus. Padedama histologo D. Petroškos, vertino histologinius preparatus.

Lazerininkai E. Gabrytė, R. Danielius ir M. Vengris sukonstravo ir užprogramavo lazerinę sistemą oftalmologinėms operacijoms atlikti.

Biologai prof. O. Rukšėnas ir A. Vaičeliūnaitė prižiūrėjo elgesį su gyvūnais ir padėjo enukleuoti akis. Prof. O. Rukšėnas taip pat dalyvavo rengiant eksperimentų metodiką.

Su bendraautoriais darbo autorė rengė mokslinius straipsnius. Vykdomą mokslo darbą viešino tarptautinėse mokslinėse konferencijose.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Triušio kaip eksperimentinio gyvūno ragenos ypatumai

Žaizdų gijimui tirti taikomi gyvūnų modeliai. Triušių ragenos anatomija panaši į žmogaus, tačiau yra ir skirtumų. Pirma, triušiai neturi Bowmano membranos, nors kolageno skaidulos po epiteliumi tankesnės ir sudaro panašų į pamatinę membraną sluoksnį (Riau, Tan et al. 2012). Antra, triušių ragenos plonesnės nei žmogaus (žr. Rezultatų sk., 4 pav.). Suaugusio lietuvių vyro ragenos centrinės dalies storis (RCS) yra $545.0 \pm 25.6 \mu\text{m}$, o moters – $544,4 \pm 33,5 \mu\text{m}$, ir šie dydžiai atitinka europidų rasės RCS (Galgauskas, Juodkaite et al. 2014). Wang optinės koherentinės tomografijos (OKT) metodu nustatė, kad vidutinis triušių dešinėsios akies ragenos storis yra $387 \pm 19,8 \mu\text{m}$, o kairiosios – $384 \pm 20,2 \mu\text{m}$, t. y. triušio ragena apie $150 \mu\text{m}$ plonesnė nei žmogaus (Wang ir Wu 2013). Triušio ragenos epitelis taip pat plonesnis nei žmogaus. Žmogaus ragenos centrinės dalies epitelio storis yra $50,6\text{--}53,4 \mu\text{m}$ (Li, Petroll et al. 1997, Reinstein, Archer et al. 2008, Li, Tan et al. 2012), o triušių – $32,2\text{--}48 \mu\text{m}$ (1 lentelė).

1 lentelė. Triušio ragenos epitelio storis

Centrinės dalies epitelio storis (μm)	Metodai	Autorius, publikacijos metai
40	Akys po enukleacijos, trimatė konfokalinė mikroskopija	Masters, 1998
$47,7 \pm 2,2$	<i>In vivo</i> konfokalinė mikroskopija	Li, Petroll et al., 1997
$45,8 \pm 2,2$	Akys po enukleacijos, didelės raiškos OKT	Reiser, Ignacio et al., 2005
$43,6 \pm 3$	<i>In vivo</i> konfokalinė mikroskopija	Jester, Li et al., 1998
47 ± 5	<i>In vivo</i> viso storio ragenos vaizdavimas naudojant Heidelbergo tinklainės tomografą su Rostoko ragenos moduliu	Petroll, Weaver et al., 2013
32,2	Ultragarsinė pachimetrija prieš pašalinant epitelį ir jį pašalinus	Tsiklis, Kymionis et al., 2008

Nepaisant minėtų skirtumų, triušis yra geras modelis, nes ragenų žaizdų gijimo klinikinė eiga panaši į žmogaus (Netto, Mohan et al. 2006). Reikia paminėti ir gijimo skirtumus: triušių ragenos susidrumscia dažniau, greičiau ir intensyviau (McCally, Connolly et al. 2006, Netto, Mohan et al. 2006). Pavyzdžiui, eksperimentuose su triušiais, kuriuos atliko Netto ir kt. (Netto, Mohan et al. 2006), po 9,0 D miopinės FRK eksimeriniu lazeriu visose triušių ragenose išsivystė intensyvi subepitelinė migla, o žmonėms po tokios korekcijos intensyvi migla nustatoma tik 2–4 % atvejų (Lipshitz, Loewenstein et al. 1997). Subepitelinė migla triušių ragenose pradeda rasti iškart po reepitelizacijos (Gibson, Tuli et al. 2013) ir būna intensyviausia po mėnesio (Marshall, Trokel et al. 1988; Gaster, Binder et al. 1989; Hanna, Pouliquen et al. 1989; Tuft, Zabel et al. 1989; Mohan, Hutcheon et al. 2003; Netto, Mohan et al. 2006; Mohan, Stapleton et al. 2008), t. y. daug anksčiau nei žmonėms. Kita vertus, triušių ragenų savybę intensyviausiai susidrumsti jau po mėnesio būtų galima laikyti šio modelio privalumu, nes tai leidžia greičiau įvertinti chirurginės procedūros baigtis. Ilgainiui ir žmonių (Hersh, Stulting et al. 1997), ir triušių (Sanders, Pujara et al. 2009) ragenos skaidrėja. Sandersas ir kt. (Sanders, Pujara et al. 2009) nustatė, kad po 6 mėnesių po FRK 193 nm ir 213 nm bangos ilgio nanosekundiniais impulsais triušių ragenose buvo likusi tik švelni subepitelinė migla.

Svarbu ir tai, kad triušio akies obuolys yra panašaus dydžio kaip žmogaus, nors pats gyvūnas nedidelis, o tai leidžia gana lengvai jį tirti klinikinėje praktikoje taikomais instrumentais, pavyzdžiui, plyšine lempa, pachimetru.

Minėtos aplinkybės lemia, kad dauguma ragenos chirurginių procedūrų, tarp jų FRK ir LASIK, buvo išbandytos su triušių ragenomis. Femtosekundinė ragenos abliacija *in vivo*, mūsų žiniomis, atlikta nebuvo.

2.2. Keratorefrakcinės chirurgijos metodų apžvalga

Lazerinė refrakcinė chirurgija prasidėjo nuo FRK, kurios pagrindas yra ragenos fotoabliacija. Lamelinės procedūros, kurios iš pradžių buvo atliekamos mechaniškai, dabar gali būti visiškai lazerinės.

JAV Amerikos Oftalmologų akademija keratorefrakcines procedūras pagal naudojamus instrumentus ir skirtingus operacijos eigos aspektus skirsto į (Rapuano 2009):

- incizines: radialinė keratotomija (RK) ir astigmatinė keratotomija (AK), savo ruožtu skirstoma į arkos pavidalo keratotomiją, limbo relaksuojančius pjūvius ir skersinę keratotomiją;

- paviršinę abliaciją lazeriu: FRK, lazerinė subepitelinė keratomilezė (LASEK, angl. *Laser Sub-Epithelial Keratomileusis*), epi-LASEK ir epi-LASIK (angl. *Epithelial Laser in situ Keratomileusis*),
- lamelines: LASIK, presbiopinis LASIK (presbiLASIK);
- ragenos implantus;
- ragenos susitraukimo procedūras: lazerinė termokeratoplastika ir kondukcinė arba radijo dažnio keratoplastika.

2.2.1. Incizinės keratotomijos

Incizinių keratotomijų idėjos paskelbtos XIX a. pabaigoje (Schiötz ir Schiötz 1885; Lucciola 1896; Lans 1898). XX amžiuje populiariausias buvo RK operacijos, kurias 1939 m. pasiūlė japonų oftalmologas Sato (Sato 1939). Jis bandė taisyti refrakcijos ydas keratokonusu sergantiems pacientams, darydamas relaksuojančias įpjovas Descemeto membranoje. Priekines RK išvystė tuometinės TSRS gydytojai. Jenalejevas 1969–1977 metais atliko 426 priekines incizijas ragenos periferijoje, taip koreguodamas 3–4 dioptrijų (D) trumparegystę (Yenaleyev 1979). Operacijas patobulino ir išpopuliarino Fiodorovas (Fyodorov ir Durnev 1981). Nepaisant šios operacijos privalumų, tokių kaip maža kaina ir nepažeistas optinis ragenos centras, refrakcijos baigtys buvo sunkiai prognozuojamos, o stabilumas buvo menkas (Waring, Lynn et al. 1990; Waring, Lynn et al. 1994; McDonnell, Nizam et al. 1996). Lietuvos oftalmologai patys RK nedarė, tačiau susidurdavo su komplikacijomis po operacijų, dažniausiai atliktų mobiliuose operacinėse, įrengtose autobusuose, kur kokybiškai atlikti operaciją buvo sudėtinga. Tai suformavo neigiamą Lietuvos oftalmologų nuomonę apie keratorefrakcinę chirurgiją.

Radialinės incizijos trumparegystei koreguoti išsivysčiusiose šalyse tapo atgyvena, bet AK astigmatizmui taisyti taikoma ir dabar. Ji pagrįsta tuo, kad, atliekant įpjovas stačiajame meridiane, tame meridiane ragena suplokštėja (Kwitko, Jovkar et al. 1996). Įpjovas galima atlikti mechaniniu būdu arba femtosekundiniu lazeriu. Įpjovos gali būti skersinės (linijinės) arba arkos pavidalo, atliekamos lygiagrečiai su limbu (Lee, Lindstrom et al. 2013). Kuo įpjovos arčiau centro, tuo daugiau dioptrijų pakoreguojama. Maksimaliai galima pakoreguoti 3,0 D. UV abliacijos, kurios yra FRK, LASIK, LASEK pagrindas, atliekamos ragenos centre, o AK incizijos daromos ragenos periferijoje arba limbe, todėl optinis centras lieka nepažeistas. Dažniausiai AK atliekama vienos operacijos metu su kataraktos ekstrakcija, kai siekiama kartu pakoreguoti rageninį astigmatizmą. Mechaninių AK, kaip ir kitų incizinių keratotomijų,

trūkumai yra perforacijos ir infekcijos rizika, akies paviršiaus suardymas, sunkiai prognozuojami korekcijos rezultatai (Lee, Lindstrom et al. 2013).

2.2.2. Paviršinės abliacijos lazeriu: FRK, LASEK, epi-LASEK ir epi-LASIK

Paviršinės abliacijos eksimeriniu lazeriu jau taikomos daugiau kaip 30 metų. Trokelis ir kt. 1983 m. paskelbė atlikę įpjuvus eksimeriniu lazeriu veršiuko enukleuotos akies ragenoje (Trokel, Srinivasan et al. 1983). Akloje žmogaus akyje pirmasis eksimerinį lazerį panaudojo vokiečių oftalmologas Seileris (Seiler, Kahle et al. 1990). Koreguojama daugelis refrakcijos ydų: trumparegystė, toliaregystė, astigmatizmas, presbiopija. Nuolat ieškoma būdų sumažinti komplikacijų pavojų ir pagerinti baigtis. Populiariausia šiuo metu yra lazerinė paviršinė abliacija, atliekama naudojant eksimerinio ArF UV lazerio nanosekundinės (10^{-12} s) trukmės impulsus.

Atliekant paviršines abliacijas, nanosekundiniu eksimeriniu 193 nm bangos ilgio arba kietojo kūno (bangos ilgis 210 ir 213 nm) lazeriu mikrometrų ($1\mu\text{m}=10^{-6}$ m) tikslumu pašalinami ragenos stromos audinių sluoksniai. Operuojant pakeičiamas ragenos gaubtumo spindulys: ragena tampa plokštesnė (trumparegystei koreguoti) arba labiau išgaubta (toliaregystei koreguoti). Operuojant trumparegę akį, reikia pašalinti daugiau audinio ragenos centre (ragena suplokštėja), o toliaregę – periferijoje (ragena labiau išsigaubia). Keičiant gaubtumą skirtinguose ragenos meridianuose, galima ištaisyti ir astigmatizmą. Reikia paminėti, kad lazerinė korekcija yra tiksliausias iš astigmatizmo korekcijos chirurginių būdų (Lee, Lindstrom et al. 2013).

Pagal standartinę FRK procedūrą mechaniškai arba alkoholiu pašalinamas ragenos epitelis, paskui lazeriu atliekama labai tiksli ragenos abliacija. Ragenos epitelis regeneruoja ir grąžina akies paviršiaus optinę kokybę. Šios procedūros trūkumai yra pooperacinis skausmas (Torres, Sancho et al. 2007), subepitelinė migla bei randėjimas (Stojanovic ir Nitter 2001), lėtas regėjimo atsigavimas (de Benito-Llopis, Teus et al. 2007).

2003 m. atsirado terminas „pažangi paviršiaus abliacija“ (angl. *advanced surface ablation*), apimantis LASEK, epi-LASEK ir epi-LASIK procedūras (Trattler ir Barnes 2008). Šių operacijų pagrindas yra stromos abliacija lazeriu kaip ir FRK procedūros metu, skiriasi tik epitelio atidailijimo būdai.

LASEK metu praskiestu alkoholiu atidailijamas ragenos epitelis iki pamatinės membranos, tada atliekama analogiška FRK procedūra, o pabaigoje epitelis grąžinamas atgal (Azar, Ang et al. 2001). Dėl didesnio skausmo ir ilgesnio pooperacinio gijimo laikotarpio ši operacija taikoma rečiau nei LASIK. Paviršinės abliacijos daž-

niau komplikuojasi subepiteline migla. Maždaug prieš dešimtmetį pradėjus operuoti su MMC, kuris sumažina ragenos drumstėjimą, LASEK populiarumas ėmė didėti, nes paviršinė abliacija rečiau komplikuojasi ragenos ektazija, o pooperacinis diskomfortas mažesnis nei po FRK. Kiti šios procedūros pranašumai, palyginti su LASIK, yra tokie, kad leidžia išvengti su lopeliu susijusių komplikacijų, epitelio įaugimo ir naktinio matymo problemų (Trattler ir Barnes 2008). Įdomu, kad tyrimai rodo, jog lopelio epitelis žūsta, todėl iš esmės ši procedūra nesiskiria nuo FRK (Taneri, Zieske et al. 2004).

Epi-LASIK procedūros metu epitelis atidalijamas ne alkoholiu, o modifikuotu mikrokeratomu (Pallikaris, Katsanevaki et al. 2003; Trattler ir Barnes 2008). Lyginant su LASEK, mažiau pažeidžiamos epitelio ląstelės ir pamatinė membrana, dėl ko išsiskiria mažiau citokinų ir vystosi silpnesnis uždegiminis atsakas. Be to, lopelis geriau prigryja. Trūkumai yra nepilni epitelio lopeliai ir stromos įtraukimas į lopelį. To bandoma išvengti taikant kitą metodą – epi-LASEK, kai prieš atidalijant epitelį epimikrokeratomu, naudojamas praskiestas alkoholis (20 %) (Camellin ir Wyler 2008).

Paviršinės abliacijos tinkamiausios asmenims, turintiems epitelio pamatinės membranos distrofiją, paviršinių ragenos randų po anksčiau atliktų RK (Trattler ir Barnes 2008). Taip pat šios operacijos rekomenduojamos žmonėms, turintiems plokšnę rageną, ir sportininkams, kuriems dėl traumos galėtų įvykti LASIK lopelio poslinkis. Paviršinės abliacijos mažiau nei lamelinės procedūros pakeičia ragenos biomechanines savybes (Trattler ir Barnes 2008). Šios operacijos turi nemažai šalinių, tačiau pagal atliekamų operacijų kiekį pasaulyje vis dar pirmauja lamelinė procedūra LASIK.

2.2.3. Lamelinės procedūros: LASIK ir presbiLASIK

Ragenos lamelinių refrakcinių operacijų pradininkais laikomi Kolumbijos oftalmologai J. Barraqueris ir L. Ruizas, paskelbę savo darbus XX amžiaus viduryje. J. Barraqueris, remdamasis idėja, kad ragenos suplokštinimui (trumparegystės korekcijai) reikia pašalinti audinius centre, o toliaregystės korekcijai reikia papildomų audinių periferijoje, nuo kurių ragena tampa gaubtesnė, sukūrė keratomilezės ir keratofakijos metodus (Barraquer 1958). Mokslininkas rankiniu keratomu išpjaudavo paviršinę ragenos dalį, ją šaldydavo, tekindavo ir prisiūdavo atgal prie stromos. L. Ruizas sukūrė automatinį mikrokeratomą ir automatinės sluoksninės keratoplastikos metodą (Casebeer, Ruiz et al. 1996). Šie metodai jau nebetaikomi, bet jų prin-

cipu pagrįstas LASIK yra dažniausiai atliekama refrakcinė operacija pasaulyje. JAV kasmet atliekama apie milijonas šių procedūrų (Hammond, Madigan et al. 2005). 1990 metais Pallikaris ir kt. paskelbė apie triušiams atliktą LASIK operaciją ir pirmasis panaudojo terminą LASIK (Pallikaris, Papatzanaki et al. 1990). Žmonėms pirmieji LASIK procedūrą atliko Buratto ir Ferraris (Buratto ir Ferrari 1992).

Operacijos metu mikrokeratomu (ranka valdomu vibraciniu peiliu) arba femtosekundiniu lazeriu atidalijamas 100–200 μm storio ragenos lopelis, jis pakeliamas, tada nanosekundiniu lazeriu atliekama stromos abliacija, ir lopelis užklojamas atgal. Lopelis prigryja per gana trumpą laiką. LASIK yra efektyvi, prognozuojama ir saugi operacija, ypač koreguojant nedidelio ir vidutinio laipsnio trumparegystę (iki 6,0 D) ir astigmatizmą iki 2,0 D (Sugar, Rapuano et al. 2002). Sunkios komplikacijos, tokios kaip ragenos ektazija, pasitaikanti 0,2–0,6 % atvejų (Pallikaris, Kymionis et al. 2001, Rad, Jabbarvand et al. 2004), ar infekcinis keratitas, yra retos, tačiau gana dažnai pacientus vargina pooperacinis sausumas dėl ragenos nervų pažeidimo, tamsoje matomi ratilai aplink šviesius objektus, sumažėjęs kontrastinis jautrumas (Sugar, Rapuano et al. 2002).

LASIK procedūros pranašumai, lyginant su FRK, yra greitesnis gijimas ir regėjimo stabilizavimasis, mažesnis pooperacinis diskomfortas, retesnė ir mažiau intensyvi subepitelinė migla, galimos geresnės baigtys koreguojant didesnes refrakcijos ydas, trumpesnis pooperacinių medikamentų lašinimo laikas, lengvesnė reoperacijos procedūra (Sugar, Rapuano et al. 2002). Šiuo metodu galima saugiau koreguoti didesnes refrakcijos ydas nei FRK būdu.

Dėl saugumo ir prognozuojamų baigčių JAV LASIK operacijos atliekamos ir lakūnams. Net 95,9 % JAV lakūnų, kuriems buvo atlikta LASIK, lopelio suformavimui naudojant femtosekundinį lazerį, teigė, kad operacija padėjo jiems dirbti efektyviau. Praėjus trimis mėnesiams po operacijos, nekoreguotas regos aštrumas, lygus 1,0, buvo nustatytas 98,3 % akių po trumparegystės ir mišraus astigmatizmo korekcijos ir 95,7 % akių po toliaregystės gydymo (Tanzer, Brunstetter et al. 2013).

LASIK būdu galima suformuoti multifokinę rageną ir taip pakoreguoti presbiopiją (Alio, Amparo et al. 2009). Šiuo metu naudojami du korekcijos tipai: periferinis presbiLASIK ir centrinis presbiLASIK. Periferinis metodas pagrįstas neigiamo asferiškumo suformavimu ragenos periferijoje, dėl ko pailgėja židinio sritis ir atitinkamai pseudoakomodacijos amplitudė, tačiau reikalingas neuroadaptacijos procesas. Centrinis metodas pagrįstas artumo zonos sukūrimu centre, panašiai kaip koreguojant bifokiniais akiniais (Alio, Amparo et al. 2009).

Pagrindiniai LASIK tipo operacijos trūkumai yra darbo su mikrokeratomu sukeltos komplikacijos, t. y. lopelio padėties bei vientisumo trūkumai: nevysiškas arba visiškai lopelio pašalinimas, netolygus lopelio storis, centrinės skylės lopelyje (Stonecipher, Ignacio et al. 2006). Kai naudojamas mikrokeratomas, didelę įtaką šios operacijos baigčiai turi žmogiškasis veiksnys, daugiausia chirurgo patirtis ir atidumas, nes mikrokeratomas valdomas rankomis.

2.2.4. Ragenos implantai

Žiedo segmento implantai įsodinami ragenos periferijoje į mechaniniu būdu arba femtosekundiniu lazeriu paruoštus kanalus. Šie implantai naudojami nedidelės ir vidutinės trumparegystės, taip pat ir netaisyklingos ragenos topografijos dėl keratoko- nuso, ektazijos po LASIK ir pan. korekcijai (Pintero, Alio et al. 2009).

Presbiopija koreguojama plokštelės pavidalo implantais, įsodinamais ragenos centre. Jie yra trijų tipų (Lindstrom, Macrae et al. 2013). Vienas jų yra refrakciniai optiniai implantai, kurių centre yra nulinė refrakcija, o periferijoje vienas ar keli artumo refrakcijos ydos korekcijai skirti žiedai. Jie implantuojami nedominuojančioje akyje. Kitas tipas yra multifokiniai ragenos paviršių modifikuojantys lęšiai, o trečiasis yra implantas su stenopine skylute.

Ragenos implantų pranašumas yra galimybė juos pašalinti arba pakeisti. Be to, skirtingai nei atliekant lazerinę abliaciją, nepašalinami ragenos audiniai. Deja, regėjimo prasme tai yra kompromisinis korekcijos variantas, nepasiekiantis regėjimo su korekciniais akiniais kokybės.

2.2.5. Ragenos susitraukimo procedūros: lazerinė termokeratoplastika ir kondukcinė arba radijo dažnio keratoplastika

Naudojant aplikatorių, kuriuo cirkuliariai periferijoje kaitinama ragena, susitraukia kolageno fibrilės ir ragena centre tampa gaubtesnė. Kondukcinę keratoplastiką rekomenduojama naudoti nedidelės toliaregystės ir astigmatizmo korekcijai (Waring ir Berry 2013), tačiau procedūra nėra populiari.

2.3. Fotoabliacija ir jai naudojamų lazerių apžvalga

Oftalmologija yra medicinos sritis, kur lazeriai dėl mažo akies dydžio ir optinių terpių skaidrumo naudojami bene dažniausiai. Dėl skirtingų oftalmologijoje naudojamų lazerių parametrų (bangos ilgis, impulso trukmė ir galia) jie atlieka skirtingas

funkcijas, iš kurių pagrindinės yra fotokoaguliacija, fotoabliacija ir fotodisrupcija.

Fotoabliacijos metu ragenai sugeriant UV fotonus nutraukiami ryšiai tarp struktūrinių organinių medžiagų molekulių ir paviršiniai audiniai pašalinami mikrometrų tikslumu be didesnio šiluminio poveikio (Krueger, Rabinowitz et al. 2010). Paviršius lieka lygus, nes pašalinami tik apšvitinti audiniai (Bende, Seiler et al. 1988). Žinoma, kad rageną sugeria trumpesnį nei 400 nm bangos ilgio šviesą, o ilgesni spinduliai prasiskverbia giliau (Sacks, Kurtz et al. 2003).

Fotoabliacijai naudojami nanosekundiniai dujiniai ir kietojo kūno lazeriai, dažniausiai dujinis eksimerinis ArF lazeris. Eksimerinis lazeris refrakcinėms operacijoms iš pat pradžių buvo pasirinktas dėl kelių priežasčių. Rageną labai gerai sugeria jo bangos ilgio (193 nm) spinduliuotė, dėl to abliacija vyksta efektyviai ir prognozuojamai (Krauss, Puliafito et al. 1986). Šiais lazeriais UV spinduliuotė gaunama tiesiogiai, be netiesinių dažnio keitiklių. Tačiau šis lazeris turi ir keletą esminių trūkumų (Vengris, Gabryte et al. 2010). Jame naudojamos nuodingos darbinės dujos, todėl klinikinėje praktikoje reikia imtis papildomų atsargumo priemonių. Lazeriui reikia nuolatinės priežiūros (reguliaraus dujų keitimo, nes naudojant jos suyra), tiksliai palaikomų aplinkos temperatūros ir drėgmės (Dougherty, Wellish et al. 1994; Tsiklis, Kymionis et al. 2008), o tai didina jo eksploataavimo kainą. Eksimerinių lazerių pluošto kokybė yra prasta, todėl daug šviesos prarandama formuojant darbinį pluoštą.

Eksimerinių lazerių trūkumu laikoma ir tai, kad abliacijos našumui (vienu impulsu pašalinamo audinio kiekiui energijos vienetui) turi reikšmės audinių hidracija. Kaip žinia, dehidruotos ragenos siejamos su hiperkorekcija, o per daug hidruotos – su hipokorekcija (Dougherty, Wellish et al. 1994). Ragenos paviršius greitai džiušta, ypač pašalinus epitelį. Medžiagos, kuriose mažiau vandens, abliuojamos stipriau (Feltham ir Stapleton 2002). Dougherty'is ir kt. (Dougherty, Wellish et al. 1994), tirdami jaučių ragenas, nustatė sausųjų sudedamųjų dalių ir hidruotų audinių abliacijos eksimeriniu lazeriu našumus. Sausųjų sudedamųjų dalių abliacijos našumu jie vadino kolageno ir kietųjų medžiagų masę, pašalintą lazerio šūviu ploto vienetui. Jis didėjo, mažėjant hidracijai. Atitinkamai, hidruotų audinių abliacijos našumas mažėjo, mažėjant hidracijai. Vadinasi, abliuojant paburkusias ragenas, galima baigtis yra miopijos hipokorekcija, o abliuojant išdžiūvusiais ragenas, galima miopijos hiperkorekcija. Fieldsas ir kt. (Fields, Taylor et al. 1994) nustatė, kad vandeniui paveiktos ragenos po abliacijos eksimeriniu lazeriu būna mažiau lygios.

Kimas ir kt. (Kim ir Jo 2001) tyrė, kaip drėkinimas veikia LASIK baigtis. Grupei pacientų jie atliko standartinę LASIK nedrėkindami ir nesusausindami ragenos, o an-

trajai (dehidracijos) grupei sudrėkino ir iškart nusausino ragenas po lopelio atkėlimo, paskui sausino ragenas abliacijos metu: pirmą kartą po 50 μm abliacijos ir vėliau kas 20 μm . Antroje grupėje buvo agresyvesnė pooperacinė uždegiminė reakcija, didesnė hiperkorekcija, bet ir didesnė miopijos regresija. Oshika ir kt. (Oshika, Klyce et al. 1998) mano, kad lazerinės abliacijos metu sukeltos smūgio bangos gali priversti skystį kauptis centre, audiniai netolygiai abliuojami ir dėl to gali susiformuoti stačios centrinės salos. Dėl skirtingo skysčių kiekio individualių ragenų audiniuose galimos netikėtos refrakcinių operacijų baigtys.

Eksimerinio lazerio slenkstinė energija, reikalinga abliacijai, nepriklauso nuo pasikartojimo dažnio. Minimalus energijos tankis (energija ploto vienetui), reikalingas žmogaus ragenos abliacijai 193 nm bangos ilgio eksimeriniu lazeriu, yra 50 mJ/cm² (Krueger ir Trokel 1985). Abliacijos gylis vienam impulsui yra susijęs su energijos tankiu, ir efektyvumas yra didžiausias, kai energijos tankis yra 150–400 mJ/cm² (Trokel, Srinivasan et al. 1983). Abliacijos gylis vienam impulsui įvairiuose audiniuose yra skirtingas.

Abliuojant lazeriais, ragenos refrakcijos pokytis apskaičiuojamas remiantis Munnerlyno formule: abliacijos gylis mikronais refrakcijos pokyčiui dioptrijomis yra lygus optinės abliacijos diametro milimetrais kvadratui, padalintam iš trijų (Munnerlyn, Koons et al. 1988). Lazerinių prietaisų gamintojai sudaro sudėtingesnes nomogramas, kuriose atsižvelgiama į konkrečios lazerinės sistemos ypatybes, koreguojamos ragenos savybes ir ilgalaikius refrakcijos pokyčius.

Per 30-ies metų laikotarpį, kai eksimeriniai lazeriai naudojami oftalmologijoje, pasikeitė pluoštelio savybės (dėmės dydis, pasikartojimo dažnis, energijos tankis), ragenos apdorojimo būdai, abliacijos profiliai. Dabar paplitusios penktosios ir šeštosios kartos sistemos, naudojančios iki 1 kHz pasikartojimo dažnio lazerius, kurių pluošto skersmuo yra 0,5–2 mm. Pirmosiose eksimerinių lazerių sistemose būdavo apdorojamas didelis ragenos plotas vienu metu, lazerio pluoštas būdavo formuojamas diafragmų sistema, impulsų energija buvo didelė, o pasikartojimo dažnis žemas. Vėliau atsirado skenuojantys plyšio pavidalo pluoštelio lazeriai, o dauguma šiuolaikinių lazerių naudoja „skraidančios dėmelės“ (angl. *flying spot*) technologiją, kai skenuojama simetrišku mažo skersmens (0,5–2 mm) pluoštu. Ši technologija leidžia abliuoti tiksliau ir tolygiau, be to, mažiau kaitinama ragena.

Daug dėmesio skiriama abliacijų profilams tobulinti. Standartinis sferocilindrinis profilis, tinkamas daugeliui pacientų, sukuria pooperacines aukštesnės eilės aberacijas. Koreguojant trumparegystę, ragena centre suplokštinama, todėl atsiranda ne-

pageidaujamos teigiamos sferinės aberacijos. Koreguojant toliaregystę, ragena centre tampa gaubtesnė ir sukuriama neigiamos sferinės aberacijos, dėl kurių pablogėja matymo kokybė (Alio, Amparo et al. 2009). Atsiradus bangos fronto analizės technologijoms ir galimybei koreguoti gydymą pagal aberometrijos duomenis, kai korekcija apskaičiuojama atsižvelgiant į unikalias kiekvienos akies aukštesnės ir žemesnės eilės optines aberacijas (angl. *wavefront-guided*), pagerėjo kontrastinis jautrumas, sumažėjo akinimas ir ratilai aplink objektus (Myrowitz ir Chuck 2009). Taikant šį tinkintą (angl. *customized*) profilį, sumažėjo aukštesnės eilės aberacijų, tačiau dažniausiai jos vis tiek būdavo didesnės nei prieš operaciją. Šio profilio trūkumas yra tas, kad, siekiant suformuoti idealiai lygų paviršių, abliuojant pašalinama daugiau audinių. Koreguojant priešoperacines aberacijas mažomis lazerio dėmėmis, reikia ypač gero centravimo operacijos metu, todėl operuojant stebimi akies obuolio judesiai ir pagal juos automatiškai koreguojama pluoštelio padėtis. Šiuolaikinėse sistemose naudojamos sudėtingos akių judesių ir rainelės registracijos sistemos, kurios gali susekti ne tik horizontalius judesius, bet ir rotaciją (Khalifa, El-Kateb et al. 2009). Pavyzdžiui, „Schwind Amaris 1050RS“ platforma (Schwind Eye-Tech-Solutions, Vokietija) turi septynių dimensijų 1050 Hz greičio akių judesių sekiklį, kuris seka vyzdį ir limbą kartu, o lazerio reakcijos laikas yra trumpesnis nei 3 ms (<http://www.eyetechsolutions.com>).

Optimizuotas (angl. *wavefront-optimized*) abliacijos profilis formuoja asferinę rageną su didesnėmis optine ir perėjimo zonomis. Operuojant šiuo būdu, nereikia prieš operaciją matuoti aberacijų ir nebūtina taip tiksliai centruoti (Myrowitz ir Chuck 2009). Kitas, abliacijos pagal topografiją, profilis rekomenduojamas netaisyklingų ragenų chirurgijai ir antrinėms operacijoms, kai reikia padidinti optines zonas ar pataisyti decentruotas abliacijas (Lin, Holland et al. 2008).

Moderniausios eksimerinės sistemos turi bangos fronto, ragenos topografijos, visos akies aberometrijos ir realaus laiko pachimetrijos galimybes, optimizuoto centravimo ir abliacijos sekimo sistemas, energijos ir šiluminės energijos reguliavimo kontrolę (Alio, Pachkoria et al. 2013). Sukurta abliacijos šalutinių produktų siurbimo sistema (<http://www.eyetechsolutions.com>). Profiliai pakoreguoti atsižvelgiant į tai, kad abliacijos zonos periferijoje pluoštelio dėmė tampa ovali ir sumažėja energijos tankis (<http://www.alconsurgical.com>). Sukurti ir kuriami nauji abliacijos profiliai, koreguojantys astigmatizmą ir presbiopiją (Rocha, Vabre et al. 2009).

Efektyvus būdas UV spinduliuotei gauti yra kietojo kūno lazerių, dažniausiai veikiančių neodimio jonų pagrindu, harmonikų generacija. Atsiradus naujiems netiesiniams kristalams, pasidarė įmanoma efektyviai generuoti penktąją Nd:YAG la-

zerių harmoniką (213 nm). Rageną sugeria UV spindulius nuo 193 nm iki 220 nm (Lembares, Hu et al. 1997), todėl šio ruožo bangos ilgio lazerio impulsai turėtų būti tinkami abliacijai ir jų poveikis (abliacijos slenkstis, abliacijos našumas, aplinkinių audinių pažeidimas) turėtų būti panašus į eksimerinio. Tyrimai (Anderson, Sanders et al. 2004; Roszkowska, Korn et al. 2004) parodė, kad 213 nm bangos ilgio impulsus galima efektyviai taikyti ragenos abliacijai, o jų mutageninis poveikis neviršija eksimerinio lazerio spinduliuotės poveikio. Rinkoje yra dvi sistemos kietojo kūno lazerių pagrindu: „Pulzar“ (300–400 Hz, 213 nm, su 0,6 mm skenuojančia dėme, CustomVis, Australija) (<http://www.customvis.com>) ir „Lasersoft“ (4 kHz, 210 nm, 0,2 mm dėmė, Katana Technologies, Vokietija) (<http://www.katanalaser.com>). Pagrindiniai šių lazerių pranašumai, palyginti su eksimeriniais lazeriais, yra gera pluoštelio kokybė, impulso energijos stabilumas, paprastesnė priežiūra, mažesnė dėmė (Tsiklis, Kymionis et al. 2008). Mažesnė dėmė ir kartu mažesnė impulso energija sumažina akustinio šoko bangų sukeltą mechaninį stresą (Krueger, Seiler et al. 2001). Be to, dėl kiek didesnio bangos ilgio jų spinduliuotę mažiau sugeria operacijų metu naudojami skysčiai, o tai lemia mažesnę drėgmės įtaką operacijos rezultatams ir sykiu geresnį rezultatų atkartojamumą. Nepaisant šių privalumų, rinkoje vyrauja technologiškai pažangios stambių gamintojų dujinės eksimerinės sistemos, kurių trūkumai tapo suvaldomi.

Kuriant naujas technologijas ragenos abliacijai, pageidautina, kad naujosios sistemos išlaikytų eksimerinių sistemų pranašumus – abliacijos greitį, atkartojamumą, sudėtingus abliacijos algoritmus.

2.4. Fotodisrupcija ir femtosekundiniai lazeriai oftalmologijoje

2.4.1. Femtosekundinių lazerių taikymo oftalmologijoje ypatumai

Nanosekundiniai neodimiu legiruoto itrio-aliuminio-granato (Nd-YAG) ir artimojo IR diapazono femtosekundiniai lazeriai audinius veikia fotodisrupcijos principu. Fotodisrupcija yra optinis audinių suardymas. Audinius suardo plazmos burbuliukas, susidaręs dėl audinių jonizacijos. Fotodisrupcijai reikia didelės impulso galios.

Nd-YAG lazeriai oftalmologijoje pradėti taikyti XX amžiaus aštuntajame dešimtmetyje. Nanosekundinės trukmės (10^{-9} s) impulsai, veikdami fotodisrupcijos principu, buvo panaudoti lęšiuo užpakalinės kapsulės discizijai ir iridotomijai. Šios procedūros iki šiol plačiai naudojamos ir laikomos auksiniu standartu (Shousha ir Yoo

2010). Deja, Nd-YAG lazeriai netinka ragenos chirurgijai, nes kolateralinis audinių pažeidimas siekia net 100 μm (Ready 1971), o visas ragenos storis yra 500–600 μm .

XX amžiaus paskutiniame dešimtmetyje sukūrus patikimus femtosekundžių trukmės impulsus generuojančius lazerius bei įrangą, leidžiančią tiksliai skenuoti ir fokusuoti, tapo įmanoma fotodisrupcija, sukelianti daug mažesnę, tik apie 1 μm , kolateralinį pažeidimą (Kurtz, Horvath et al. 1998; Sletten, Yen et al. 1999). Dėl trumpesnės impulso trukmės sumažėja slenkstinis energijos tankis, ypač skaidriose terpėse, todėl mažiau pažeidžiami aplinkiniai audiniai (Sugar 2002). Kadangi ragena yra pralaidi infraraudonajai apie 1000 μm bangos ilgio šviesai, skirtingai nei eksimerinio lazerio UV spinduliuotei, šio bangos ilgio pluoštus galima sufokusuoti pageidaujamame gylyje (Stern, Schoenlein et al. 1989; Juhasz, Loesel et al. 1999).

Femtosekundinio lazerio prototipą oftalmologijoje XX amžiaus paskutiniame dešimtmetyje pradėjo taikyti Juhaszas ir kt. (Juhasz, Kastis et al. 1996). Juhaszas neklydo manydamas, kad femtosekundinis lazeris XXI amžiuje taps labiausiai vertinamu oftalmologiniu skalpeliu (Juhasz, Loesel et al. 1999). Pirmasis femtosekundinis lazeris lamelinei ragenos chirurgijai JAV Maisto ir vaistų administracijos (angl. *Food and Drug Administration, FDA*) buvo patvirtintas 2000 metais (Sugar 2002), ir pirmoji jo funkcija buvo lopelio atidalijimas LASIK operacijos metu. Tai buvo JAV kompanijos „IntraLase“ sukurtas 6 kHz pasikartojimo dažnio prietaisas. „IntraLase“ naudojamas femtosekundinis lazeris yra kietojo kūno sinchronizuotų modų neodimio stiklo lazeris, kurio bangos ilgis yra artimajame IR diapazone (1053 nm), o impulso trukmė yra keli šimtai femtosekundžių (Juhasz, Kastis et al. 1996). Impulsai generuojami diodu kaupinamame osciliatoriuje, išplečiami nuo 200 fs iki 50 pikosekundžių ($1\text{ps}=10^{-12}\text{s}$), paskui sustiprinami ir suspaudžiami iki 500 fs (Perry ir Mourou 1994). Pirmosios kartos prietaisu 9 mm skersmens lopelio atidalijimas užtrukdavo 2 min. (Binder, Sarayba et al. 2008), o tai gerokai ilgiau nei rankiniu mikrokeratomu.

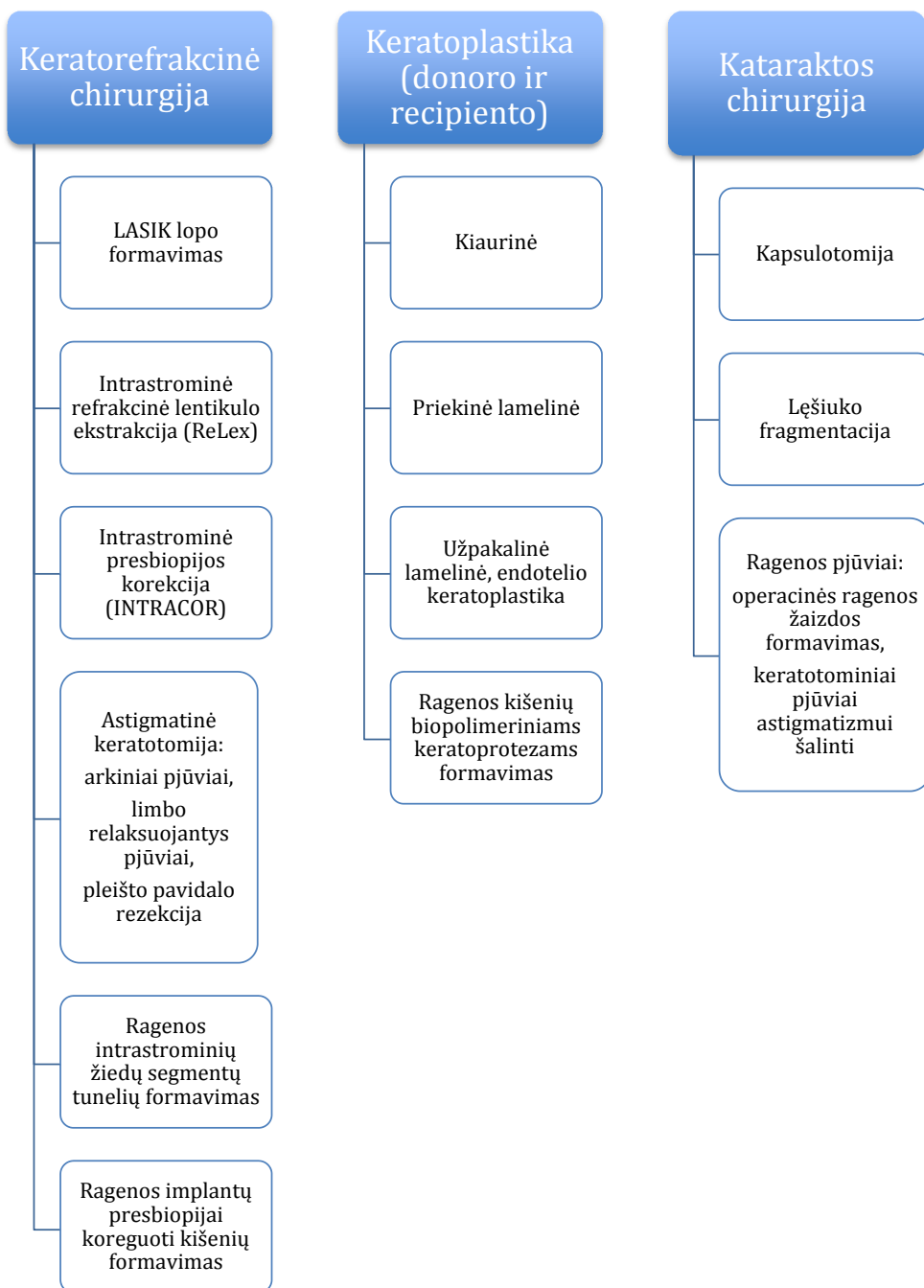
Šiuo metu rinkoje esančius femtosekundinius lazerius galima suskirstyti į dvi kategorijas: pirmajai priklausytų didesnės energijos (μJ) ir mažesnio pasikartojimo dažnio (kHz), antrajai – mažesnės energijos (nJ) ir didesnio pasikartojimo dažnio (MHz) lazeriai (Farjo, Sugar et al. 2012). Didesnės energijos sistemos generuoja didesnius intrastrominius dujų burbuliukus, impulsai klojami didesniais atstumais, o mažesnės energijos lazeriais impulsai klojamos tankiau, burbuliukai mažesni. Apie 300–500 fs trukmės impulsai fokusuojami nedideliame programuotame gylyje, kur, pasiekus slenkstį, generuojama plazma. Plazma plečiasi su smūgine banga, ir, išgarinus nedidelį audinių tūrį, sukuriamas lokalus kelių mikronų dydžio burbuliuko pavidalo

pažeidimas (Sugar 2002). Burbuliukų dujos (anglies dvideginio ir vandens garai) pašalinama pro aplinkinius stromos audinius. Burbuliukams susilieję, suformuojamas vientisas pjūvio paviršius. Reguliuojant dėmės dydį, atstumą tarp dėmių ir dėmių gylį ragenoje, galima programuoti norimo pavidalo pjūvį (Sugar 2002). Programinė ir optomechaninė įranga leidžia greitai keisti fokusavimo gylį, jei reikia statmenos įpjovos, arba skenuoti spirališkai bei zigzago pavidalu, jei reikia lygiagrečios su ragenos paviršiumi įpjovos; pjūvį galima pradėti nuo viršaus į apačią arba atvirkščiai.

Šiuolaikiniai femtosekundiniai lazeriai veikia jau megahercų (MHz) dažniu, pavyzdžiui, „FEMTO LDV Crystal Line“ (Ziemer, Šveicarija) sistemos dažnis yra didesnis nei 5 MHz (Zhang, Zhou et al. 2013). Labai pagreitėjo lopelio atpjovimas, pavyzdžiui, „WaveLight®Wavelight FS200“ (Alcon, JAV) femtosekundine sistema standartinio lopelio atpjovimas užtrunka tik 6 s (<http://www.alconsurgical.com>). Bendra energija visai operacijai yra mažesnė su didesnės energijos sistemomis (Farjo, Sugar et al. 2012).

Tiksliai programuojamas pageidaujamo pavidalo, krypties ir gylio pjūvis be aplinkinių audinių pažeidimo atvėrė femtosekundiniams lazeriams plačias galimybes taikyti oftalmologijoje. Pirmame paveiksle parodytos femtosekundinio lazerio pritaikymo sritys, kurios aprašytos tolesniuose skyriuose. Iš retesniųjų vertėtų paminėti šių lazerių naudojimą neinvazinei transsklerinei glaukomos chirurgijai (perilimbiniai skleros audiniai yra santykinai pralaidūs artimiesiems IR spinduliams) (Chai, Chaudhary et al. 2010), tinklainės fotodisrupcijai ir vaizdo tyrimams (Soong ir Malta 2009), ragenos biopsijai (Yoo, Kymionis et al. 2008). Kanellopoulosas (Kanellopoulos 2009) femtosekundiniu lazeriu suformavo kišenę riboflavinui atlikdamas ragenos kolageno sutvirtinimo operaciją ankstyvajam keratokonusui gydyti. Įdomų aklų akių pūslinės keratopatijos simptominio gydymo būdą pasiūlė Kymionis ir kt. (Kymionis, Diakonis et al. 2014). Jie suleido į femtosekundiniu lazeriu suformuotą kišenės sili-kono aliejų, todėl sumažėjo ragenos edema bei susilpnėjo skausmas.

XXI amžiaus oftalmologija nebeįsivaizduojama be femtosekundinių lazerių, kurių pritaikymo sritys ir mastai nuolat plečiasi. Toliau plačiau panagrinėsime femtosekundinio lazerio naudojimo galimybes, nes manome, kad lazeriu „Pharos“, naudotu mūsų eksperimentuose, būtų galima atlikti daugumą, o gal net visas šiuo metu įmanomas intervencijas.



1 pav. Femtosekundinių lazerių naudojimas oftalmochirurgijoje

2.4.2. Femtosekundiniai lazeriai keratorefrakcinėje chirurgijoje

2.4.2.1. Ragenos LASIK lopelio formavimas femtosekundiniu lazeriu

Lopeliui atpjauti dar dažnai naudojamas mechaninis peilis (mikrokeratomas), tačiau jį vis labiau išstumia femtosekundinis lazeris (Binder 2004, Kezirian ir Stonecipher 2004; Durrie ir Kezirian 2005). Pirmieji ragenos lopelius žmogaus akyje femtosekundiniu lazeriu atidalijo Vengrijos mokslininkai Ratkay-Traubas ir kt. (Ratkay-Traub, Juhasz et al. 2001). Nuo 2001 iki 2011 metų femtosekundiniais lazeriais atlikta daugiau nei 2 milijonai procedūrų, iš kurių dauguma buvo LASIK lopelio atidalijimas (Feizi 2011).

Skirtingų gamintojų platformos skiriasi techniniais parametrais (impulso energija ir pasikartojimo dažniu), akies prisiurbimo ir aplanacijos būdu (plokščias arba gaubtas kontaktinis paviršius), skenavimo pavidalu (spiralinis arba rastras), funkcijų įvairove (įskaitant kiaurinius pjūvius) ir prietaiso mobilumu (Kim, Sutton et al. 2011). Programinė įranga padeda sufokusuoti impulsus į tiksliai nustatytą gylį, reguliuoti skenavimo pavidalą. Galima reguliuoti lopelio plotį, gylį, vyrio plotį, lopelio formą (ovalus ar apskritas) ir krašto kampus (Farjo, Sugar et al. 2012). Suformavus lopelį lazeriu, chirurgas jį mechaniškai pakelia, nors kol kas femtosekundiniu lazeriu suformuotą lopelį pakelti yra sunkiau nei atidalytą mikrokeratomu (Farjo, Sugar et al. 2012).

Formuojant lopelį, akį reikia imobilizuoti ir tam naudojamas prisiurbimo žiedas su įtvirtinimu, kurio kontaktinis paviršius gali būti plokščias arba gaubtas. Kai paviršius plokščias, lengviau suformuoti pjūvį plokštumoje, tačiau procedūros metu reikia smarkiau prisiurbti, padidėja akispūdis ir gali trumpam pablogėti regėjimas. Kai kontaktinis paviršius gaubtas, akispūdis padidėja mažiau, regėjimas išlieka, tačiau sunkiau sufokusuoti impulsus, be to, procedūros metu judant akiai gali nutrūkti prisiurbimas (Farjo, Sugar et al. 2012).

Nors kaina gerokai didesnė, femtosekundinis lazeris baigia išstumti mechaninį mikrokeratomą dėl šių priežasčių:

- mikrokeratomas valdomas ranka, o lazeris – kompiuteriu, todėl sumažėja žmogiškojo veiksnio nulemtų komplikacijų tikimybė;
- lazeriu suformuojami tikslesni ir geriau prognozuojami lopelio parametrai (Zhou, Tian et al. 2011): storis, skersmuo, gylis, vyrio padėtis ir plotis (Sutton ir Hodge 2008);

- suformuojamas pagedaujamo ir tolygaus storio lopelis (von Jagow ir Kohnen 2009), kuris gali būti plonesnis nei atidalytas mikrokeratomu, o tai reikalinga, kai plonesnė ragena ir (ar) didesnė refrakcijos yda;
- lazeriu atidalytas paviršius taisyklingesnis, stroma lygesnė (Binder, Sarayba et al. 2008; von Jagow ir Kohnen 2009; Murakami ir Manche 2011);
- lazeriu galima suformuoti lopelio kraštą su „raktais“ – specialios formos išpjovomis, todėl operacijos pabaigoje ragenos lopelį lengviau tiksliai grąžinti į vietą;
- netinkamai suformavus lopelį ir jo nepakėlus, ragena atgauna pradinę formą ir skaidrumą iškart, kai susigeria dujų burbuliukai (Farjo, Sugar et al. 2013);
- lopelis tvirčiau prigyja (Kim, Kim et al. 2006).

Šie pranašumai lemia geresnius operacijų rezultatus, sumažina komplikacijų tikimybę. Komplikacijų pasitaiko retai, pavyzdžiui, Haftas ir kt., ištyrę 2003–2006 metais operuotas 4772 akis, nustatė, kad komplikacijų išsivystė mažiau nei 1 % atvejų (Haft, Yoo et al. 2009). Chango ir kt. duomenimis, komplikacijos sudarė 0,63 %, t. y. 19 iš 3009 atvejų (Chang 2008).

Lyginant su mikrokeratomu, po femtosekundinio LASIK rečiau pasitaiko epitelio defektų, nevienodo storio ir nepilnų lopelių, „sagų pavidalo“ skylių (Shousha ir Yoo 2010). Po operacijos rečiau po lopeliu įauga epitelis (Shousha ir Yoo 2010), rečiau sausėja akys (Salomao, Ambrosio et al. 2009), būna geresnis kontrastinis jautrumas, mažiau pooperacinio astigmatizmo bei aukštesnės eilės aberacijų (Medeiros, Stapleton et al. 2007), greitesnė rehabilitacija (Binder 2004), rečiau reikia reoperacijų (Kim, Sutton et al. 2011).

Pagal tokias klininkines baigtis, kaip regos aštrumas ir refrakcija, kol kas negalima vienareikšmiškai teigti, kad femtosekundinis lazeris geresnis už mikrokeratomą. Dalis tyrėjų nerado statistiškai patikimo skirtumo tarp regėjimo rezultatų po LASIK operacijos, atliktos mechaniniu mikrokeratomu ir femtosekundiniu lazeriu (Azar, Ang et al. 2001; Patel, Maguire et al. 2007; Chan, Ou et al. 2008; Calvo, McLaren et al. 2010). Iš kitos pusės, nemažai tyrimų rodo femtosekundinio lazerio pranašumus (Kezirian ir Stonecipher 2004; Durrie ir Kezirian 2005; Montes-Mico, Rodriguez-Galietero et al. 2007; Tanna, Schallhorn et al. 2009). Durrie ir Kezirianas (Durrie ir Kezirian 2005), ištyrę regos aštrumą nuo 1 dienos iki 3 mėnesių po LASIK procedūros, nustatė, kad nekoreguotas regos aštrumas buvo geresnis formuojant lopelį femtosekundiniu lazeriu, palyginti su „Hansatome“ mikrokeratomu. Jų tyrimuose po

3 mėnesių pirmuoju atveju sferinis ekvivalentas buvo artimesnis emetropijai ir buvo mažesnis astigmatizmas. Tanna ir kt. (Tanna, Schallhorn et al. 2009) palygino baigtis po operacijos „IntraLase“ femtosekundiniu lazeriu ir Moria „One Use“ mechaniniu mikrokeratomu. Jie nustatė, kad femtosekundinio lazerio grupėje daugiau akių pasiekė nekoreguotą regos aštrumą 20/16 (dešimtainėje sistemoje, kuri naudojama Lietuvoje, atitinka 1,25), ir mažiau akių prarado dvi ar daugiau eilučių po savaitės ir po mėnesio.

Reikia paminėti ir specifines komplikacijas, pasitaikančias femto-LASIK procedūros metu: atidalijus lopelį, gali susidaryti neskaidrus burbuliukų sluoksnis, kuris trukdo sekti akių judesius abliuojant eksimeriniu lazeriu. Dar neaišku, ar burbuliukų sluoksnis kaip nors veikia pačią abliaciją eksimeriniu lazeriu (Farjo, Sugar et al. 2012). Dujos gali prasiveržti į priekinę akies kamerą (Lifshitz, Levy et al. 2005) arba vertikalia kryptimi. Neskaidraus burbuliukų sluoksnio trukdžių padeda išvengti centripetalinis bei rastro pavidalo skenavimas, didesnis lopelio atidalijimo greitis ir mažesnė energija (Soong ir Malta 2009).

Iš pooperacinių komplikacijų minėtini praeinantis jautrumas šviesai, t. y. po poros savaitių atsirandanti šviesos baimė be uždegimo reiškinių (Stonecipher, Dishler et al. 2006; Trattler ir Barnes 2008), vaivorykštinis spindėjimas (Krueger, Thornton et al. 2008), difuzinis lamelinis keratitas (Trattler ir Barnes 2008). Stonecipheris ir kt. (Stonecipher, Dishler et al. 2006) nustatė, kad praeinančio jautrumo šviesai sindromas tapo retesnis, sumažinus lazerio energiją, todėl jie šio sindromo priežastimi laikė smūginių bangų poveikį keratocitams arba ragenos nervams.

Manoma, kad vaivorykštinis spindėjimas gali atsirasti dėl šviesos difrakcijos nuo grotelių pavidalo lopelio užpakalinio paviršiaus. Komplikacija buvo dažnesnė esant didesnei rastro energijai – 1,0–1,1 μ J, palyginti su 0,8 μ J (Bamba, Rocha et al. 2009). Svarbu ne tik mažesnė energija ir mažesni atstumai tarp dėmių, bet ir tinkama optinės sistemos priežiūra (Farjo, Sugar et al. 2012).

Pirmosios kartos femtosekundiniai lazeriai naudojo didesnės energijos ir mažesnio pasikartojimo dažnio impulsus, o dėmės buvo klojamos didesniais atstumais viena nuo kitos. Dėl didesnės energijos susidarydavo didesni intrastrominiai dujų burbuliukai, o dėl retesnių dėmių buvo sunkiau atidalyti lopelį, susiformuodavo ne-lygesnis paviršius. Nustatyta, kad mažesnė energija ir mažesni atstumai tarp dėmių lemia lygesnius paviršius (Serrao, Buratto et al. 2012). Tobulėjant technologijoms, komplikacijos tampa dar retesnės (Shousha ir Yoo 2010).

Pacientui renkantis chirurginę procedūrą, svarbų vaidmenį atlieka ir psichologinis veiksnys – „be peilio“ atliekama operacija. Nors mikrokeratomo procedūrų komplikacijos irgi gana retos ir nors lazerinė sistema yra nepalygti sudėtingesnė ir brangesnė nei mikrokeratomas, femto-LASIK tampa vis populiareesnė.

2.4.2.2. *Intrastrominė refrakcinė lentikulo ekstrakcija*

Jau XX amžiaus paskutiniame dešimtmetyje buvo bandoma femtosekundiniu lazeriu ragenos stromoje suformuoti lęšį ir jį pašalinti, t. y. visą operaciją atlikti vien femtosekundiniu lazeriu, nenaudojant eksimerinio (Krueger, Juhasz et al. 1998; Ratkay-Traub, Ferincz et al. 2003). Apie 2006 metus, kai femtosekundinis lazeris jau buvo plačiai naudojamas lopeliui atpjauti LASIK operacijos metu, šią idėją įgyvendino „Carl Zeiss Meditec“ (Jena, Vokietija) kompanija, ir kol kas tik šios kompanijos sukurta lazerinė platforma „VisuMax“ įmanoma šią operaciją atlikti. Dėl labai tikslaus fokusavimo galima preciziškai suformuoti pageidaujamo storio asferinę intrastrominę lentikulą, lazeriu atliekant du intrastrominius pjūvius, susikertančius periferijoje. Lentikulą pašalinus, sumažėja ragenos laužiamoji geba ir koreguojama trumparegystė. Tai vadinama ReLEx (Shah ir Shah 2011). Pasiūlyti du šios operacijos variantai:

- ReLEx flex – femtosekundinė plokštelės ekstrakcija, kai lentikulas pašalinamas atkėlus lopelį (angl. *femtosecond lamellar extraction* – FLEx) (Sekundo, Kunert et al. 2008),
- ReLEx SMILE, arba „šypsena“, – mažo pjūvio femtosekundinė plokštelės ekstrakcija (angl. *small-incision femtosecond lamellar extraction* – SMILE), kai lentikulas pašalinamas nepakeliant lopelio, o ištraukiant jį pro mažą šypsenos pavidalo pjūvį (Sekundo, Kunert et al. 2011; Shah, Shah et al. 2011).

Tyrimai rodo, kad FLEx ir SMILE yra minimaliai invazinės, saugios, efektyvios ir perspektyvios refrakcinės operacijos, koreguojančios trumparegystę ir trumparegį astigmatizmą (Sekundo, Kunert et al. 2008; Blum, Kunert et al. 2010; Sekundo, Kunert et al. 2011; Shah, Shah et al. 2011; Ang, Chaurasia et al. 2012). Angas ir kt. (Ang, Tan et al. 2012) nurodo šiuos ReLEx SMILE privalumus: trumpesnę chirurginės procedūros trukmę, mažiau šalutinių poveikių. Kadangi nereikia pakelti lopelio, turėtų sumažėti akių sausumo rizika. Nustatyta, kad po SMILE operacijos ragenos jautrumas susilpnėja mažiau nei po femto-LASIK (Li, Zhou et al. 2014), rečiau atsiranda aukštesnės eilės ir sferinių aberacijų (Lin, Xu et al. 2014).

Lentikulą būtų galima išsaugoti ir implantuoti atgal į rageną (Ang, Tan et al. 2012). Kai Liu ir kt., triušiams vienoje akyje atlikę ReLEx SMILE operaciją, ištrauktą

lentikulą implantavo į kitoje akyje suformuotą kišenę, po 6 mėnesių lentikulas buvo visiškai integruotas, o ragena skaidri (Liu, Zhu et al. 2012). Riau ir kt. sėkmingai reimplantavo užšaldytus lentikulus beždžionėms (Riau, Angunawela et al. 2013).

Shah ir kt. ReLEx būdu (abiem variantais) 329 akyse operavo trumparegystę iki 10,0 D (Shah, Shah et al 2011) ir aprašė šios procedūros pranašumus bei trūkumus. Naują 200 kHz lazerinę platformą lentikulas suformuojamas per 50–55 s. Dėl ReLEx SMILE operacijos metu atliekamo mažo pjūvio nepasislenka lopelis, gyjant mažiau skauda. Nereikalingos plačios perėjimo zonos, todėl galima suformuoti mažą lopelį, mažiau sutrikdant ragenos biomechaniką. Autoriai nustatė, kad refrakcijos, prognozavimo ir stabilumo rezultatai buvo panašūs į rezultatus po modernios chirurgijos eksimeriniu lazeriu, tačiau regos aštrumas po ReLEx gerėjo lėčiau. Gijimo ir regėjimo funkcijas ankstyvuoju laikotarpiu pavyko pagerinti, pakeitus lentikulo formavimo būdą: skenuojant užpakalinę jo dalį nuo periferijos į centrą, o priekinę nuo centro į periferiją, dujų burbuliukai procedūros metu nespėja pasiekti centro ir paveikti formuojamų paviršių taisyklingumo (Shah ir Shah 2011). Net ir pakeitus skenavimo būdą, regos aštrumas iki 6 mėnesių po operacijos buvo blogesnis, nei operuojant eksimeriniu lazeriu.

Nepaisant privalumų, kol kas šie metodai negali visiškai pakeisti LASIK ir FRK. Blumas ir kt. (Blum, Kunert et al. 2013) 2013 metais paskelbė pirmuosius toliaregystės korekcijos rezultatus, kurie ne visai atitiko lūkesčius: nors procedūra buvo efektyvi ir šalutinių poveikių pasitaikė mažiau nei 5 % atvejų, tačiau pooperacinė refrakcija buvo nestabili ir nepakankamai prognozuojama. Be to, ReLEx netinka reoperacijoms, jei pirmos operacijos metu nepavyksta pasiekti tinkamos refrakcijos arba jei išsivysto komplikacijų – šiais atvejais vėlesnė korekcija atliekama eksimeriniu lazeriu.

2.4.2.3. *Intrastrominė presbiopijos korekcija (INTRACOR)*

„Technolas Perfect Vision“ (Vokietija, JAV) kompanija sukūrė būdą femtosekundiniu lazeriu pakeisti ragenos laužiamąją gebą be pjūvio. Ruizas ir kt. (Ruiz, Cepeda et al. 2009) pasiūlė INTRACOR metodą, kuriuo galima koreguoti nedidelę emetropinę ar hipermetropinę presbiopiją. Šis presbiopijos korekcijos būdas 2009 metais patvirtintas Europos Sąjungoje, tačiau kol kas leidžiama operuoti tik nedominuojančią akį (Khoramnia, Holzer et al. 2013). Procedūros metu lazeriu suformuojami koncentriniai intrastrominiai žiedai, centruoti aplink regėjimo ašį. Iki ragenos paviršiaus išlaikomas apie 100 μm atstumas, taigi epitelis nepažeidžiamas (Khoramnia, Holzer et

al. 2013). Dėl biomechaninių ragenos pakitimų pagerėja regėjimas iš arti, o regėjimas tolumui nepablogėja. Procedūros metu beveik neskauda, nėra uždegimo reakcijos, nes nepažeidžiamas epitelis, ir paciento regėjimas pagerėja jau po kelių valandų. Šiuo būdu galima koreguoti tik nedideles refrakcijos ydas.

2.4.2.4. Kiti femtosekundinio lazerio taikymai keratorefrakcinėje chirurgijoje

Femtosekundinė astigmatinė keratotomija (AK) yra techniškai lengvesnė nei peiliuku atliekamos incizijos. Koreguojamas astigmatizmas po keratoplastikų (Hoffart, Proust et al. 2009; Nubile, Carpineto et al. 2009), nors baigčių prognozė nėra tiksli. Abbey (Abbey, Ide et al. 2009) femtosekundiniu lazeriu koregavo ir natūralų astigmatizmą. Incizijas galima atlikti kataraktos chirurgijos metu (Nagy, Cionni et al. 2011), naudojant tą patį lazerinį prietaisą, kuriuo atliekama kapsulotomija ir branduolio fragmentacija.

Arkos pavidalo incizijomis femtosekundiniu lazeriu pavyko koreguoti didesnę astigmatizmą nei mechaniniu būdu (Hoffart, Proust et al. 2009). Femtosekundinių arkinių įpjovų pranašumai prieš mechanines (Lee, Lindstrom et al. 2013) yra didesnis saugumas, tikslesnis gylio apskaičiavimas (Ruckl, Dextl et al. 2013). Galima suprogramuoti priekinį ir užpakalinį gylį bei incizijos kampą. Atliekant intrastromines femtosekundines AK, išlaikomas epitelio vientisumas, dėl ko sumažėja infekcijų rizika ir diskomfortas (Ruckl, Dextl et al. 2013). Nekiaurines intrastromines incizijas vėliau, jei reikia dėl nepakankamo rezultato, galima atidaryti mechaniškai.

Ghanem aprašė atvejį, kai femtosekundiniu lazeriu pleišto pavidalo rezekcija buvo koreguotas net 20,0 D astigmatizmas, atsiradęs po keratoplastikos (Ghanem ir Azar 2006).

Femtosekundiniu lazeriu galima suformuoti tunelius ragenos intrastrominiams žiedo segmento pavidalo polimetilmetakrilato implantams. Toks tunelis yra tikslesnių matmenų ir atkartojamas, o pati procedūra trumpesnė ir lengvesnė (Kubaloglu, Cinar et al. 2010), nors regėjimo ir refrakcijos baigtys, palyginti su mechaniniais pjūviais, nesiskiria (Pintero, Alio et al. 2009).

Seyeddain ir kt. (Seyeddain, Bachernegg et al. 2013) femtosekundinį lazerį panaudojo formuodami kišenės ragenos implantams, skirtiems presbiopijai koreguoti emetropinėse akyse.

2.4.3. Femtosekundiniai lazeriai keratoplastikoje

Femtosekundiniu lazeriu galima suprogramuoti įvairių pavidalų ir krypčių tikslus nekontaktinius ragenos pjūvius, o tai atveria naujų keratoplastikos galimybių operuojant ir donoro, ir recipiento audinius. Pjūvius įmanoma atlikti ir drumstoje, paburkusioje ragenoje (Alio, Pachkoria et al. 2013).

Kiaurinė keratoplastika laikoma sėkmingiausia iš visų organų transplantacijų. Atliekant kiaurinę femtokeratoplastiką, audiniai mažiau pažeidžiami ir greičiau gyja nei po mechaninio pjūvio, todėl galima operuoti labiau pažeistas ragenas (pavyzdžiui, su didesne edema, labiau surandėjusias ir pan.), išsivysto mažesnis pooperacinis astigmatizmas. Be to, galima suformuoti pageidaujamų formų pjūvius: skrybėlės, grybo, zigzago, eglutės, liežuvio formos griovelio, spynos ir rakto (Shah ir Gritz 2012); atitinkamos geometrijos donoro ir recipiento audinių paviršius. Gijimas greitesnis, kai pjūvio vidinis skersmuo yra mažesnis už išorinį. Baharas ir kt. (Bahar, Kaiserman et al. 2008) nustatė, kad mechaniškai stabiliausi buvo femtosekundiniu lazeriu suformuoti skrybėlės pavidalo pjūviai, palyginti su zigzago, grybo ir eglutės formos pjūviais. Birnbaumas (Birnbaum, Wiggermann et al. 2012), atlikęs 123 kiaurinės femtokeratoplastikas, nustatė, kad operacija saugi, žaizdos sugyja greičiau, todėl galima anksčiau pašalinti siūles, tačiau refrakcijos rezultatai nesiskiria nuo įprastinės keratoplastikos. Femtokeratoplastikos dažnesnį naudojimą stabdo lazerinės sistemos kaina ir tai, kad donoro ir recipiento ragenas tenka paruošti lazerių kambaryje, o ne operacinėje (Shousha ir Yoo 2010).

Atsiradus galimybei tiksliau atidalyti donoro ir recipiento ragenos sluoksnius, XXI amžiuje populiarėja įvairios nekiaurinės transplantacijos rūšys. Priekinė lamine keratoplastika (PLK), kai transplantuojami paviršiniai ragenos audiniai, paliekant Descemeto membraną ir endotelį, pasižymi retesnėmis atmetimo reakcijomis, be to, išsaugomas akies vientisumas. Padedant femtosekundiniams lazeriams, PLK tapo greitesnė, tikslesnė, atkartojama bei techniškai lengviau atliekama. Atliekant giliają PLK, kurios indikacijos yra keratokonusas, stromos distrofijos, gilios herpinės leukomos, sutrumpėja mokymosi kreivės, sumažėja perforacijos rizika. Kai drumstis paviršinė, galima atlikti paviršinę PLK. Yoo ir kt. sėkmingai atliko priekinę besiulę PLK (Yoo, Kymionis et al. 2008). Deja, lazeriu sunkiau sekasi atlikti gilesnius pjūvius. Procedūra atliekama prisiurbus rageną, o dabartinės skenavimo sistemos atkartoja prisiurbto (suplokštinto arba išgaubto) paviršiaus netolygumą stromoje, dėl to išsivysto netaisyklingas astigmatizmas (Shousha ir Yoo 2010).

Užpakalinė lamelinė keratoplastika femtosekundiniu lazeriu buvo atlikta triušių (Sutton ir Kim 2010) ir audinių banko akims. Endotelio keratoplastikai femtosekundiniai lazeriai suteikia tokius pranašumus, kaip ploni atkartojami donoro ragenos pjūviai, geresnis paviršių lygumas (Soong ir Malta 2009). Donoro audinių paruošimui, nepaisant minėtų pranašumų, femtosekundiniai lazeriai naudojami dar retai: iš 12 071 JAV endotelio keratoplastikai paruoštų ragenų tik 25 atvejais panaudotas femtosekundinis lazeris. Gilioji intrastrominių audinių disekcija mikrokeratomu kol kas yra morfologiškai ir funkciškai pranašesnė (Binder 2008).

Sarayba ir kt. femtosekundinį lazerį laboratorijoje panaudojo keratoprotezams implantuoti (Sarayba, Kurtz et al. 2005).

2.4.4. Femtosekundiniai lazeriai kataraktos chirurgijoje

XXI amžiaus pirmojo dešimtmečio pabaigoje femtosekundiniai lazeriai pradėti naudoti kataraktos chirurgijai. Lęšiuko chirurgijai reikia kitokio lazerio pluoštelio nei ragenos chirurgijai: fokusuoti reikia didesniame plote ir giliau. Padidėjus dėmės dydžiui ir pluoštelio išsibarstymui skleroziniame drumstame lęšiuke, reikia 5–10 kartų didesnės impulso energijos (Sutton, Bali et al. 2013). Femtosekundiniais lazeriais gali būti atliekama kapsulotomija (Nagy, Takacs et al. 2009), lęšiuko branduolio fragmentacija (Nagy, Takacs et al. 2009) ir ragenos pjūviai: operacinės ragenos žaizdos formavimas ir keratotominės įpjovos astigmatizmui šalinti (Nubile, Carpineto et al. 2009).

Yra sukurtos kelios femtosekundinės sistemos, kurios skiriasi akies prisiurbimo ir aplanacijos būdu, kuris gali būti plokščias arba gaubtas, su skysčiu (angl. *liquid optics*); priekinio segmento atvaizdavimo metodu (optinė koherentinė tomografija, arba Sheimpflugo metodas); gydymo algoritmais ir prietaiso mobilumu. Lazeriu atlikus intrastrominius pjūvius, kapsulotomiją ir branduolio fragmentaciją, pacientas dažniausiai perkeliamas į kitą operacinę, kur steriliomis sąlygomis mechaniniais instrumentais pabaigiami pjūviai, atliekama fakoemulsifikacija ir implantuojamas intraokulinis lęšiukas.

Kapsulotomiją lazeriu galima padaryti tiksliai cirkuliarią, centruotą ir pageidaujamo skersmens, o tai leidžia sėkmingiau implantuoti sudėtingus torinius ir multifokinius intraokulinius lęšius (Friedman, Palanker et al. 2011). Branduolio emulsifikacijai po femtosekundinės fragmentacijos reikia mažiau ultragarsinės energijos, o kartais net visai nereikia naudoti ultragarsinio prietaiso (Nagy, Takacs et al. 2009;

Abell, Kerr et al. 2013). Dėl mažesnės energijos prarandama mažiau ragenos endotelio ląstelių, ankstyvuoju pooperaciniu laikotarpiu rečiau vystosi ragenos edema, todėl gali pagreitėti gijimas (Abell, Kerr et al. 2013). Atsiradus naujoms lęšiuo fragmentacijos galimybėms, patobulinus chirurgijos techniką ir sukūrus lazeriu suskaldyto lęšiuo pašalinimo būdus, ultragarsinė fakoemulsifikacija gali tapti nebereikalinga (Abell, Kerr et al. 2013).

Femtosekundinė kataraktos chirurgija yra saugi ir efektyvi, nors dar neįrodyta, kad regėjimo baigtys būtų geresnės negu fakoemulsifikacijos (Abell, Kerr et al. 2012). Femtosekundinės kataraktos ekstrakcijos trūkumas, palyginti su ultragarsine fakoemulsifikacija, yra didelė kaina (Abell ir Vote 2014).

Dickas ir kt. (Dick ir Schultz 2013) femtosekundinę lazerinę sistemą panaudojo kūdikių kataraktos pašalinimo operacijoms, atlikdami priekinę kapsulotomiją, lęšiuo fragmentaciją ir užpakalinę kapsulotomiją. Suaugusiesiems atliekama tik priekinė kapsulotomija, o kūdikiams – dažnai ir užpakalinę kapsulotomija, nes palikta užpakalinė kapsulė drumstėja. Naudojant femtosekundinį lazerį, išvengiama kapsulės plyšimų. Autoriai dirbo su „Optimedica® Catalys™“ (Optimedica, Sunnyvale, Kalifornija, JAV) sistema, aplanacijai naudojančia skysčio pripildytą sąsają, kuri nesuplokština akies paviršiaus ir akispūdį prisiurbus padidina ne daugiau kaip 10–12 mm Hg.

Nepaisant kainos ir chirurgų mokymosi kreivės, lazerinei chirurgijai prognozuojama palanki ateitis. Chirurgams įgavus patirties ir gerėjant technologijoms, komplikacijų labai sumažėja. Skeptikams galima priminti fakoemulsifikacijos pradžią, kai dalis chirurgų abejojo ir šio metodo pranašumais prieš ekstrakapsulinę lęšiuo ekstrakciją.

2.5. Abliacijos greitis ir LASIK operacijos trukmė. Transepitelinė fotorefrakcinė keratektomija

Didesnis abliacijos greitis laikomas pranašumu dėl kelių priežasčių. Visų pirma, ragenos hidracija turi įtakos eksimerinio lazerio abliacijos našumui (Dougherty, Wellish et al. 1994). Ilgiau operuojant, stroma gali išdžiūti ir refrakcijos baigtys gali neatitikti numatytų. Dėl ilgesnės UV spinduliavimo trukmės galimas terminis audinių pažeidimas (Gaster, Binder et al. 1989). Trumpesnė procedūra yra patogesnė ne tik pacientui, bet ir chirurgui. Be to, sumažėja atsitiktinių akių judesių rizika (Khoramnia, Salgado et al. 2012). Didesnis greitis ypač svarbus, kai reikia gilesnės abliacijos, t. y. šalinant didesnes refrakcijos ydas (Han, Chen et al. 2012).

Šiuolaikinių lazerių gamintojai konkuruoja greičiu. Pavyzdžiui, „Technolas 217z100“ eksimerinis lazeris (Bausch and Lomb Surgical, Irvinas, Kalifornija, JAV) 6 mm optinėje zonoje abliuoja 1,0 D per 6 s, o greitai laikomas „Allegretto Wave Eye-Q“ (WaveLight GmbH, Alcon, Fort Worth, Teksasas, Kalifornija, JAV) 400 Hz lazeris – 1,0 D per 2 s (Han, Chen et al. 2012). Lazerine sistema „Mel80“ (Carl Zeiss Meditec, Vokietija) miopinė 5,0 D abliacija 6 mm optinėje zonoje trunka 15 s (Reinstein, Vogelsang et al.). Tobulėjant technologijoms abliacijos greitis didėja. Pavyzdžiui, naujaja „WaveLight Concept System1000“ lazerine sistema (Concept System 1000; WaveLight GmbH, Erlangenas, Vokietija) viena miopijos dioptrija 6,5 mm optinėje zonoje pašalinama per ~1,2 s (Khoramnia, Salgado et al. 2012), tačiau šios sistemos nėra rinkoje. „Schwind Amaris 1050RS“ sistema (Schwind Amaris 1050RS, Schwind eye-tech-solutions GmbH & Co. KG) vienos miopinės dioptrijos abliacija 6 mm optinėje zonoje užtrunka 1,3 s (<http://www.eye-tech-solutions.com>).

LASIK operacijos trukmė priklauso ne tik nuo stromos abliacijos, bet ir nuo lopelio atidalijimo laiko. Atliekant LASIK šiuolaikinėmis femtosekundinėmis sistemomis, lopelis suformuojamas per 10–40 s, o akies prisiurbimo laikas priklauso nuo chirurgo patirties (Farjo, Sugar et al. 2012). Atidalijus lopelį femtosekundiniu lazeriu, pacientą reikia perkelti prie eksimerinio lazerio, t. y. kito prietaiso. Chirurgui reikia pasirinkti operacijos eigą: galima suformuoti lopelius abiejose akyse, o paskui perkėlus pacientą atlikti abliaciją femtosekundiniu lazeriu (lopelis, lopelis, abliacija, abliacija); arba vienoje akyje atlikti visą operaciją ir tada operuoti kitą akį (lopelis, abliacija, lopelis, abliacija) (Farjo, Sugar et al. 2012). Procedūra užtrunka keliomis minutėmis ilgiau nei dirbant su mechaniniu mikrokeratomu (Farjo, Sugar et al. 2012). Akivaizdu, kad operacijos trukmė sutrumpėtų, jei būtų įmanoma abu LASIK etapus atlikti vienu lazeriu ir nereikėtų paciento kilnoti tarp dviejų prietaisų.

Didelis abliacijos greitis yra viena pagrindinių transepitelinės abliacijos sąlygų. TransFRK yra paviršinės abliacijos tipas, kai epitelis šalinamas ne mechaniškai ar alkoholiu, o lazeriu ir nesustojant iškart po to abliuojama stroma. Šis abliacijos būdas iš pradžių buvo taikomas netaisyklingoms ragenoms pakoreguoti, pavyzdžiui, po penetruojančios keratoplastikos ar giliosios sluoksninės keratoplastikos (Pedrotti, Sbabo et al. 2006), dėl recidyvinio epitelio įaugimo (Chen, Stojanovic et al. 2010). Atsiradus didesnio pasikartojimo dažnio ir mažesnės dėmės lazeriams, TransFRK tapo įmanoma taikyti ir taisyklingų ragenų refrakcijai koreguoti. Transepitelinę abliaciją galima atlikti dviem būdais. Senesnės kartos eksimeriniais lazeriais pirmiausia buvo

pašalinamas epitelis, o paskui lęšis formuojamas stromoje (Buzzonetti, Petrocelli et al. 2009). Kai buvo sukurtos didelio dažnio ir mažų dėmių „skraidančiosios dėmelės“ technologijos, tapo įmanomas kitas būdas, kai epitelio ir stromos abliacija yra vientisa, ji pradedama nuo lęšio formavimo epitelyje, o epitelio komponentas šalina- mas vėliau pagal apskaičiuotą standartinį epitelio modelį (Aslanides, Padroni et al. 2012; Aslanides, Georgoudis et al. 2015). Tokio tipo procedūra atliekama „Schwind Amaris“ 1050 Hz platforma (Schwind Eye-Tech-Solutions, Vokietija) ir vadinama „apversta“ (angl. *reverse*) TransFRK. Analogišką TransFRK, kai iš karto epitelyje su- formuojamas taisyklingas asferinis paviršius ir paskui ragena abliuojama tolygiai, lai- kant, kad epitelio storis yra 65 μ , galima atlikti 0,6 mm dvilypio 1 KHz (2x500 Hz) skraidančios dėmelės dažnio eksimeriniu lazeriu (iRES, iVIS Technology, Taranto, Italy) (Stojanovic, Chen et al. 2013). „Apverstos“ TransFRK technikos trūkumas yra tas, kad epitelio storis nematuojamas, o numanomas, todėl akyse, kurių epitelio storis nestandartinis, gali būti pašalinama daugiau ragenos audinio (kai epitelis plonesnis), o ragenose, kurių epitelis storesnis, gali būti atlikta seklesnė abliacija ir suformuota mažesnė optinė zona (Stojanovic, Chen et al. 2013).

Atlikus TransFRK pacientams, turintiems nedidelę ir vidutinę trumparegystę bei nedidelį astigmatizmą, nustatyta, kad procedūra yra greitesnė nei įprastinė FRK, po- operacinis skausmas silpnesnis ir subepitelinė migla retesnė. Pooperacinio regos aš- trumo rezultatai buvo panašūs (Fadlallah, Fahed et al. 2011; Stojanovic, Chen et al. 2013). Esant didelei trumparegystei, rezultatai skyrėsi. Tyrimai (Ghadhfan, Al-Rajhi et al. 2007) rodo, kad šių akių geriausi regos aštrumo rezultatai nustatyti po TransFRK, palyginti su LASIK, LASEK ir FRK su mechaniniu epitelio pašalinimu. Aslanides ir kt. (Aslanides, Georgoudis et al. 2015) taip pat nustatė geresnes regos aštrumo baigtis po „apverstos“ TransFRK su MMC, esant didelei trumparegystei. Kimas ir kt. (Kim, Shah et al. 1998), atlikę tyrimus su triušiais, nustatė, kad po TransFRK priekinėje stromoje buvo mažesnė keratocitų apoptozė ir tai gali lemti mažesnę pooperacinį drumstumą ir randėjimą.

TransFRK yra patraukli procedūra ne tik dėl greičio ir patogumo. Pacientai ver- tina tai, kad visi etapai atliekami be peilio, be prisilietimo (Stojanovic, Chen et al. 2013). Chirurgui šią procedūrą lengviau atlikti (Fadlallah, Fahed et al. 2011), nes nereikia mechaniškai valyti epitelio.

Stojanovic ir kt. (Stojanovic, Chen et al. 2013) nurodo atkartojamos baigčių pra- sme transepitelinės abliacijos tris sąlygas: pirma, pakankamas greitis, siekiant išveng-

ti ragenos dehidracijos; antra, tolygus kiekvieno abliacijos sluoksnio radialinis storis, siekiant, kad epitelį būtų galima pašalinti neformuojant lęšio ir nekeičiant refrakcijos; ir, trečia, nepriklausomai nuo abliacijos gylio gaunamas lygus stromos paviršius. Šiuo metu TransFRK atliekama dar gana retai, nes ją galima atlikti tik didelio dažnio lazeriais, pavyzdžiui, jau minėtomis „iRES“ arba „Schwind Amaris“ 1050 Hz platformomis.

Dėl didelio abliacijos greičio ir mažo dėmės dydžio naujaja femtosekundine lazerine sistema būtų įmanoma atlikti ir įvairias TransFRK modifikacijas, t. y. lęšį formuoti būtų galima pradėdant nuo epitelio arba stromoje.

2.6. Ragenos žaizdų gijimas po paviršinės abliacijos ir LASIK bei subepitelinę miglą įtakojantys veiksniai

Žaizdų gijimo įvairovė ir kiekvieno gyvo organizmo individualumas lemia keratorefrakcinės chirurgijos baigtis – hiperkorekciją, hipokorekciją, stromos drumstį (Netto, Mohan et al. 2005). Šios komplikacijos dažnesnės po FRK nei po LASIK, nes gijimo atsakas po FRK yra intensyvesnis dėl epitelio ir pamatinės membranos pažeidimo (Nakamura, Kurosaka et al. 2001; Stramer, Zieske et al. 2003).

Po refrakcinės chirurgijos ragenos stromoje gali būti matomi du patologinio histologinio atsako tipai (Meltendorf, Burbach et al. 2007): paprastasis randas ir fibrozinis randas. Paprastajam randui būdingas stromos ląstelių (keratocitų) išretėjimas. Toks randas, atsirandantis centrinėje lamelinės žaizdos po LASIK dalyje, kliniškai dažniausiai būna nepastebimas. Fibroziniame stromos randui būdingas stromos ląstelių sutankėjimas, miofibroblastų atsiradimas ir kolageno fibrilių dezorganizacija. Toks randas, susidarantis po FRK, vadinamas subepiteline migla (angl. *haze*).

Kaip jau minėta, subepitelinė migla po FRK žmonėms pasiekia maksimumą 6–9 mėnesį, o vėliau lėtai nyksta (Netto, Mohan et al. 2005). Triušių ragenose migla būna intensyviausia praėjus mėnesiui po FRK, o vėliau jos irgi skaidrėja (Mohan, Hutcheon et al. 2003).

Wilsonas (Wilson 2012) nurodė du subepitelinės miglos tipus po lazerinės korekcijos. Pirmasis ir dažnesnis yra švelni migla, matoma praėjus 1–3 mėnesiams po FRK beveik visose ragenose, įskaitant akis, kurių klinikiniai rezultatai puikūs. Manoma, kad šio tipo miglą lemia ne miofibroblastai ir jų gaminama tarpląstelinė matrica, o dėl ragenos kristalino gamybos padrumstėję ragenos fibroblastai (Jester, Moller-Pedersen et al. 1999). Tai kliniškai nereikšminga migla, praeinanti per metus (Netto,

Mohan et al. 2005). Tokios drumsties intensyvumas priklauso nuo keratektomijos gylio (Moller-Pedersen, Cavanagh et al. 1998). Drumstis dingsta, kai išnyksta fibroblastai ir išsilygina stromos kolagenas. Kitas tipas yra kliniškai reikšminga paviršinės stromos drumstis, atsiradusi praėjus 1–5 mėnesiams po FRK, ji vadinama vėlyvąja subepiteline migla ir lemia blogas baigtis: nenykstančią ragenos drumstį, refrakcinių rezultatų regresiją ir netaisyklingą astigmatizmą (Lipshitz, Loewenstein et al. 1997; Wilson 2012; Mohan, Hutcheon et al. 2003).

Kaip ir kodėl ragena susidrumsčia? Ragenos skaidrumą lemia taisyklingas vienodo skersmens kolageno skaidulų išsidėstymas stromoje ir tarpląstelinėje matricoje esantys proteoglikanai bei glikozaminoglikanai (Netto, Mohan et al. 2005). Keratocitai yra atsakingi už ragenos stromos tarpląstelinės matricos gamybą ir išlaikymą (Jester, Barry et al. 1994). Pažeidus epitelį, išsiskiria citokinai ir augimo faktoriai: interleukinas IL-1 α ir IL-1 β , navikų nekrozės faktorius TNF- α , kaulų morfogeniniai proteinai BMP-2 ir BMP-4 (angl. *bone morphogenetic protein*), epidermio augimo faktorius ir trombocitų kilmės augimo faktorius PDGF (angl. *platelet derived growth factor*) (Santhiago, Netto et al. 2012). IL-1 α ir IL-1 β išlaisvinami iš epitelio ląstelių tik tada, kai tos ląstelės sužeidžiamos arba žūva.

Pamatinė membrana veikia kaip barjeras, trukdantis kai kuriems augimo faktoriams patekti į stromą. Wilsono (Wilson 2012) manymu, epitelio pamatinė membrana atlieka rageną reguliuojančios struktūros vaidmenį: ji reguliuoja iš epitelio kilusių augimo faktorių ir tarpląstelinės matricos komponentų patekimą prie stromos ląstelių, iš kurių galėtų vystytis miofibroblastai. Pamatinę membraną pažeidus, citokinai ir augimo faktoriai pasiekia stromą ir, prisijungę prie keratocitų ląstelių receptorių, sukelia biologinį atsaką: keratocitų apoptozę (Wilson, He et al. 1996) ir nekrozę, keratocitų aktyvaciją, keratocitų proliferaciją (Zieske, Guimaraes et al. 2001), chemokinių gamybą ir miofibroblastų atsiradimą (Jester, Petroll et al. 1999). Nuomonę, kad keratocitai aktyvuojami tik pažeidus epitelį, patvirtino ir Morishige ir kt. (Morishige, Kesler-Diaz et al. 2008), kurie nustatė, kad femtosekundinė ragenos stromos foto-disrupcija nepakeliant lopelio nesukelia keratocitų aktyvacijos ir ragenos subepitelinės miglos. LASIK procedūros metu pamatinė membrana centre nepažeidžiama, todėl keratocitų apoptozė ir gijimo procesai vyksta giliau stromoje, kur nepatenka iš epitelio augimo faktoriai, skatinantys miofibroblastų atsiradimą ir išlikimą (Mohan, Hutcheon et al. 2003).

Buvo manoma, kad miofibroblastai ragenoje atsiranda iš ragenos kamieninių ląstelių, t. y. keratocitų, arba iš fibroblastų, kurie savo ruožtu susiformuoja iš ragenos kerato-

citų. Pastaraisiais metais nustatyta, kad miofibroblastai gyvūnų modelyje gali atsirasti iš kaulų čiulpuose kilusių ląstelių (Santhiago, Singh et al. 2011), nors dar neaišku, iš kurių. Barbosos ir kt. tyrimai taip pat rodo, kad miofibroblastai gali atsirasti iš kaulų čiulpų kamieninių ląstelių, tačiau šie mokslininkai neatmeta galimybės, kad galimas ir pirmasis būdas – iš ragenos keratocitų ir (ar) fibroblastų (Barbosa, Chaurasia et al. 2010). Wilsonas (Wilson 2012) iškėlė hipotezę, kad ragenos miofibroblastai gali atsirasti ir iš keratocitų kilmės, ir iš kaulų čiulpų kilmės kamieninių ląstelių, o vienu ar kitu dominavimas priklauso nuo žaizdos tipo, genetinių veiksnių ir kitų nežinomų įtakų. Taip pat dar neaišku, ar skiriasi skirtingos kilmės miofibroblastų funkcijos (Wilson 2012).

Miofibroblastai yra neskaidrios ląstelės, sklaidančios šviesą ir gaminančios mažiau kristalinių nei keratocitai. Dėl miofibroblastų atsiranda stromos drumstis (Dawson, Edelhauser et al. 2005). Normalioje nepažeistoje ragenoje miofibroblastų nėra (Chaurasia, Kaur et al. 2009). Kiaurinių žaizdų gijimo procese miofibroblastai atlieka teigiamą funkciją – padeda sugrąžinti ragenos vientisumą. Jie sutraukia žaizdas, išskiria tarpląstelinę matricą ir padeda suaugti gretimams audiniams (Wilson 2012). Po paviršinės ragenos abliacijos miofibroblastai kaupiasi priekinėje stromoje iškart po pamatine membrana (Mohan, Hutcheon et al. 2003). Kokią funkciją jie atlieka būtent šioje vietoje, dar nežinoma (Wilson 2012).

Sudėtingas ląstelių atsakas, įskaitant uždegiminių ir kitų ląstelių, išsivysčiusių iš kaulų čiulpų, įsiskverbimą į stromą iš limbo kraujagyslių ir ašarų (O'Brien, Li et al. 1998), lemia stromos pakitimus ir epitelio ląstelių gijimą per stromos ir epitelio augimo faktorių (keratinocitų augimo faktorius, hepatocitų augimo faktorius) išsiskyrimą. Sugijus pamatinei membranai ir sumažėjus transformuojančio augimo faktoriaus TGF (angl. *tissue growth factor*) lygiui, interleukinai IL-1 α ir IL-1 β gali nulemti miofibroblastų, susijusių su ragenos subepiteline migla, apoptozę. Gali būti, kad ragenose po FRK, atliktos koreguojant nedidelę trumparegystę, per pirmas kelias savaites miofibroblastų apoptozė viršija jų gausėjimą, todėl sumažėja miofibroblastų, gaminančių netvarkingą tarpląstelinę matricą, o tai nulemia skaidresnę rageną (Wilson 2012). Net kai miofibroblastų daug ir drumstis intensyvi, epitelio pamatinė membrana laikui bėgant atsigauna, TGF- β sumažėja ir miofibroblastai išnyksta apoptozės būdu (Wilson 2012). Išnykus miofibroblastams, ragena gali likti drumsta dėl jų išskirtos neskaidrios tarpląstelinės matricos (Wilson 2012). Toliau ragena skaidrėja ir dėl to, kad keratocitai ir galbūt kitos ląstelės reabsorbuoja ir reorganizuoja netaisyklingą tarpląstelinę matricą (Netto, Mohan et al. 2005).

Kaip matome, gyjant žaizdoms po refrakcinės chirurgijos, atsiradę miofibroblastai gali trukdyti pooperaciniam ragenos skaidrumui. Iškelta hipotezė, kad skirtingos kilmės (iš ragenos ar iš kaulų čiulpų kilusių ląstelių) miofibroblastai skirtingai reaguoja į gydymą steroidais (Santhiago, Netto et al. 2012; Wilson 2012). Reaguojantys į steroidus miofibroblastai yra kilę iš kaulų čiulpų ląstelių, o nereaguojantys – iš ragenos fibroblastų ar kitų iš keratocitų kilusių ląstelių (Wilson 2012). Vėlyvoji kliniškai reikšminga subepitelinė migla po FRK 10–15 % atvejų mažėja gydant steroidų lašais (Salomao ir Wilson 2009). Kitų 85–90 % pacientų ragenų šie lašai neveikia. Kadangi neįmanoma atskirti, kam gydymas padės, visiems pacientams steroidus patariama palašinti savaitę. To paties paciento abi akys į steroidus reaguoja vienodai.

Nors nurodoma nemažai veiksnių, turinčių įtakos subepitelinės miglos atsiradimui, tačiau tikslios priežastys ir mechanizmai vis dar neaiškūs. Mohanas ir kt. nustatė, kad miofibroblastų atsiradimas ir proliferacija kokybiškai ir kiekybiškai skyrėsi po FRK, atliktos dėl didelės trumparegystės, lyginant su FRK, atliktos dėl nedidelės trumparegystės, arba LASIK dėl didelės trumparegystės korekcijos (Mohan, Hutcheon et al. 2003). Keratocitų apoptozė ir tolesnis žaizdos gijimo atsakas buvo tuo ryškesnis, kuo gilesnė buvo paviršinė abliacija (Mohan, Hutcheon et al. 2003).

Kadangi subepitelinė migla priklauso nuo keratektomijos gylio, gilesnės abliacijos dažnai atliekamos naudojant mitomiciną C (MMC). Iki MMC eros vėlyvoji subepitelinė migla daug dažniau išsivystydavo koreguojant didesnę nei –6,0 D trumparegystę ir retai pasitaikydavo koreguojant mažesnę nei –5,0 D trumparegystę (Lipshitz, Loewenstein et al. 1997; Kuo, Lee et al. 2004).

Kiti veiksniai, lemiantys subepitelinę miglą po FRK, yra maža abliacijos zona (Rajan, O’Brart et al. 2006), nelygus stromos paviršius po abliacijos, epitelizacijos trukmė, epitelio pamatinės membranos pašalinimas, didelio astigmatizmo korekcija, UV spindulių poveikis pooperaciniu laikotarpiu, status perėjimo zonos kraštai ir genetinis polinkis (Santhiago, Netto et al. 2012; Serrao and Lombardo 2005, Wilson 2012). Į rizikos grupę patenka akys po ankstesnės ragenos chirurgijos ir turinčios nepakankamą ašarų plėvelę (Trattler ir Barnes 2008). Aukšta paviršiaus temperatūra abliacijos metu turi neigiamą poveikį ragenos gijimui ir skatina drumstėjimą (Kitazawa, Maekawa et al. 1999; Shraiki ir Arba-Mosquera 2011).

Kai kurie eksimerinių lazerių modeliai, kurie abliuodavo ne taip lygiai, buvo labiau siejami su vėlyvąja subepiteline migla (Wilson 2012). Netto ir kt. (Netto, Mohan et al. 2006) paskelbė eksperimentų su triušiais rezultatus, kurie įrodo, jog abliuoto

paviršiaus nelygumas ir su juo susijęs miofibroblastų atsiradimas lemia pooperacinę subepitelinę miglą. Kuo nelygesnis paviršius, tuo didesnis miofibroblastų tankumas priekinėje stromoje ir intensyvesnė subepitelinė migla. Ragenose su subepiteline migla buvo rasti bazinės membranos struktūriniai pakitimai, kurių nebuvo nustatyta ragenose be drumsčių.

Kai kuriems pacientams subepitelinė migla atsiranda ir po negilios abliacijos ir tam gali turėti įtakos genetinis polinkis (Wilson 2012). Gali būti, kad šių pacientų epitelio pamatinės membranos labiau pralaidžios TGF- β ir trombocitų kilmės augimo faktoriui (Wilson 2012).

Ragenos gijimo mechanizmai po abliacijos yra sudėtingi ir dar iki galo neaiškūs. Vienas mūsų darbo uždavinių buvo nustatyti, kuo gijimas po naujos procedūros – abliacijos femtosekundiniais UV impulsais – skirsis nuo gijimo po abliacijos eksimeriniu lazeriu.

2.7. Mitomicinas C ir jo panaudojimas keratorefrakinėje chirurgijoje

Kaip minėta, vėlyvasis drumstumas yra viena sunkesnių pooperacinių paviršinės abliacijos komplikacijų, ypač koreguojant didesnes refrakcijos ydas. Gijimo procesui reguliuoti ir subepitelinei miglai išvengti profilaktiškai naudojamas MMC. Nors nėra aišku, ar MMC negrįžtamai nepaveikia keratocitų ir nepailgina gijimo proceso, tačiau jis plačiai naudojamas kitiems negu etiketėje nurodytiems tikslams (angl. *off label*) jau daugiau kaip 10 metų. Vieni pirmųjų MMC panaudojo Caronesas ir kt. (Carones, Vigo et al. 2002). Šis vaistas buvo sukurtas kaip sisteminis chemoterapinis preparatas, o oftalmologijoje pirmiausia buvo ir tebėra naudojamas glaukomos ir sparninės plėvės chirurgijoje. MMC yra genotoksinis antibiotikas, kuris blokuoja DNR sintezę ir slopina ląstelių mitozę (Santhiago, Netto et al. 2012). Citotoksiškumo mechanizmai nėra visiškai aiškūs (Santhiago, Netto et al. 2012). MMC slopina keratocitų proliferaciją ir fibroblastų atsiradimą. Nors nuo MMC suaktyvėja keratocitų apoptozė ir nekrozė, bet tai nelaikoma svarbiausiu mechanizmu, lemiančiu klinikinę efektyvumą. Nėra nustatyta, kad MMC lėtintų reepitelizaciją (Teus, de Benito-Lis et al. 2009). Nerimą dėl ilgalaikio MMC poveikio kelia tyrimai, kurie rodo, kad priekinėje stromoje, praėjus net šešiams mėnesiams po operacijos, randama mažiau ląstelių. Dėl to gali atsirasti vėlyvųjų nepageidaujamų ragenos struktūros ir funkcijų pokyčių (Netto, Mohan et al. 2006). Prieštarungus rezultatus gavo MMC poveikio ragenos endotelio ląstelėms, kurios neregeneruoja, tyrimai (Santhiago, Netto et al.

2012). Nustatyta, kad triušių ragenose po eksimerinės FRK su MMC epitelizacija nesulėtėjo ir po 4 savaičių išsivysčiusi subepitelinė migla buvo mažiau ryški (Lai, Wang et al. 2004).

Reikėtų paminėti, kad akyse, operuotose naudojant MMC, daug sunkiau nyksta vėlyvoji subepitelinė migla. Manoma, kad MMC, slopindamas stromos ląstelių mitozę, sumažina ekstraceliulinę matricą sutvarkančių keratocitų kiekį (Netto, Mohan et al. 2006).

Nėra vienodos nuomonės dėl dozių: naudojama MMC koncentracija yra 0,002–0,02 %, veikimo trukmė – nuo 12 s iki 2 min. Netto ir kt., ištyrę dviejų koncentracijų (0,002 % ir 0,02 %) ir trijų trukmių (12 s, 1 min. ir 2 min.) MMC poveikį triušių ragenoms po 9,0 D FRK, nustatė, kad MMC visais atvejais buvo vienodai efektyvus subepitelinės miglos profilaktikai ir gydymui (Netto, Mohan et al. 2006). Thornton ir kitų (Thornton, Xu et al. 2008) atlikti žmonių akių tyrimai parodė, kad standartinė koncentracija (0,02 %) buvo efektyvesnė operuojant didesnę nei 6,0 D trumparegystę ir atliekant gilesnę nei 75 μm abliaciją. Paprastai naudojama standartinė koncentracija, o trukmė priklauso nuo abliacijos gylio bei nuo to, ar procedūra pirminė, ar tai yra reoperacija (Santhiago, Netto et al. 2012). Atliekant paviršinės abliacijos operacijas, rekomenduojama MMC naudoti profilaktiškai, koreguojant didesnę nei 4,0–6,0 D trumparegystę, 1,25 D ar didesnę astigmatizmą bei atliekant gilesnę nei 50–75 μm abliaciją (Lacayo ir Majmudar 2005; Shah ir Wilson 2010). Sia ir kt. (Sia, Ryan et al. 2014) operavo JAV armijos personalo, turinčio vidutinę ir didelę trumparegystę, akis trimis būdais: FRK, FRK su MMC ir LASEK. Jų tyrimai rodo, kad po FRK su MMC subepitelinė migla išsivystė rečiau, tačiau praėjus metams po operacijų refrakcinės baigtys, lyginant šiuos tris metodus, nesiskyrė.

Žaizdų gijimas ir LASIK baigtys taip pat priklauso ir nuo to, ar kreipiamas dėmesys į blefarito bei ašarų sistemos disfunkcijų diagnostiką ir gydymą (Albietz ir Lenton 2004).

Daugelis triušio ir žmogaus ragenų gijimo aspektų yra panašūs. Torricelli (Torricelli, Singh et al. 2013) ir kt. elektroniniu mikroskopu tyrė triušių ragenas po FRK. Triušio, panašiai kaip žmogaus, ragenos gijimo procesas priklausė nuo epitelio pamatinės membranos pažeidimo. Su šios membranos pažeidimu buvo susijęs stromos miofibroblastų atsiradimas ir jų ilgas išsilaikymas. Autoriai nustatė, kad ilgalaikė ragenos subepitelinė migla priklausė nuo nenormalios epitelio pamatinės membranos regeneracijos (Torricelli, Singh et al. 2013).

Triušiams, kaip ir žmonėms, profilaktiškai FRK procedūros metu naudojant MMC, ragenos drumstėja mažiau. Xu ir kt. (Xu, Liu et al. 2001) atliko -10,0 D trumparegystės korekciją eksimeriniu lazeriu, dešinioms akims naudodami 0,02 % MMC (FRK+MMC grupė), o kairiosioms jo nenaudodami (FRK grupė). FRK grupėje subepitelinė migla tiriant plyšine lempa pasiekė 3 laipsnį, o FRK+MMC grupėje ji buvo ne didesnė nei 1 laipsnio. FRK+MMC grupės ragenų priekinėje stromoje buvo statistiškai mažiau keratocitų.

Netto ir kt. (Netto, Mohan et al. 2006), siekdami nustatyti, koku būdu MMC mažina ragenų subepitelinę miglą po FRK bei ištirti vaisto dozės ir poveikio trukmės įtaką, 224 triušiams atliko -9,0 D FRK, naudodami MMC arba SBT. Atlikę imunohistocheminius tyrimus, jie nustatė, kad MMC sukelia keratocitų ir miofibroblastų apoptozę, tačiau pagrindinis drumsties slopinimo ar gydymo efektą lemiantis veiksnys yra keratocitų ar kitų ląstelių, iš kurių formuojasi miofibroblastai, replikacijos blokavimas. Jie nustatė, kad gydymas, kurio trukmė buvo nuo 12 sekundžių iki 1 minutės naudojant 0,002 % MMC, triušio modelyje buvo toks pat efektyvus, kaip ir naudojant didesnės koncentracijos preparatą ir ilgesnės trukmės gydymą. Autoriai pažymi, kad keratocitų priekinėje stromoje sumažėjimas gali būti vėlyvųjų komplikacijų pagrindas.

Refrakcinių operacijų rezultatai priklauso nuo ragenos žaizdų gijimo supratimo. Nuolat vykdomais tyrimais tikimasi iki galo ištirti sudėtingą gijimo procesą, sugebėti jį valdyti ir taip išvengti su juo susijusių refrakcinės chirurgijos komplikacijų.

3. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

Ekspirimentai femtosekundiniu lazeriu „Pharos“ (UAB „Šviesos konversija“, Vilnius, Lietuva, www.lightcon.com) buvo atliekami „Šviesos konversijos“ laboratorijoje ir Vilniaus universiteto (VU) Fizikos fakulteto lazerinių tyrimų centre 2009–2013 metais. Operacijos nanosekundiniais UV eksimerinio lazerio impulsais buvo atliekamos UAB Akių lazerinės chirurgijos centre, šias operacijas atliko gyd. Algimantas Gutauskas. Gyvūnai buvo laikomi VU Biochemijos instituto Biologinių modelių skyriaus gyvūnų laboratorijoje, kur juos prižiūrėjo vivariumo darbuotojos, vadovaujamos dr. Virginijos Bukelskienės. Histologinius tyrimus Valstybiniame patologijos centre atliko dr. Donatas Petroška.

Gavę Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimus Nr. 0180, Nr. 0213, eksperimentus atlikome su burgundiškais 3–16 mėnesių amžiaus triušiais, sveriančiais 1,3–4 kg. Prieš operaciją triušius apžiūrėdavome plyšine lempa ir pasirinkdavome sveikas ragenas. Iš viso operuotas 81 triušis.

Atlikome tris eksperimentų serijas:

- pirmoji buvo skirta triušio ragenos abliacijos femtosekundiniais UV impulsais operacijos ir baigčių vertinimo protokolui parengti,
- antroji – FRK femtosekundiniais UV impulsais įvertinti ir palyginti su FRK nanosekundiniais UV eksimerinio lazerio impulsais,
- trečioji – greitai transepitelinei abliacijai optimizuotais didesnės galios femtosekundiniais UV impulsais įvertinti ir palyginti su transepiteline abliacija nanosekundiniais UV eksimerinio lazerio impulsais.

3.1. Pirmoji eksperimentų serija.

Triušio ragenos abliacijos femtosekundiniais UV impulsais operacijos ir baigčių vertinimo protokolo parengimas

Lazeris „Pharos“ yra pramoninė sistema, kurią reikėjo pritaikyti abliacijai UV impulsais. Pirmosios serijos eksperimentai atlikti 16 triušių 32 akyse. Abi triušių akis operavome todėl, kad taip buvo galima paaukoti mažiau triušių.

Ekspirimentų tikslai buvo:

- optimizuoti femtosekundinio lazerio parametrus triušio ragenai,
- sukurti triušio ir jo akies imobilizacijos sistemą operacijos metu,
- pritaikyti lazerinę sistemą eksperimentams su triušiais,

- parengti operacijos protokolą ir nustatyti pooperacinio gydymo schemą,
- išsiaiškinti, kurie iš mums prieinamų metodų tinka gijimui ir baigtims įvertinti,
- atlikti bandomąsias operacijas eksimeriniu lazeriu.

Atliktos 36 procedūros (2 lentelė). Trijose akyse buvo atlikta miopinė abliacija femtosekundiniais UV impulsais, o po 5 mėnesių tose pačiose akyse atlikta abliacijos našumo kalibracija. Vienoje akyje praėjus 5 mėnesiams po femtosekundinės abliacijos buvo atlikti hidracijos eksperimentai.

2 lentelė. Pirmosios eksperimentų serijos procedūros

Procedūra	Procedūrų skaičius
Miopinė abliacija femtosekundiniais UV impulsais	24
Abliacija su hidracija	1
Hipermetropinė transepitelinė abliacija femtosekundiniais UV impulsais	1
Mechaninis epitelio pašalinimas be abliacijos	1
Miopinė abliacija nanosekundiniais UV eksimerinio lazerio impulsais	4
Abliacijos našumo kalibracija	5
Iš viso	36

Optimizuojant femtosekundinio lazerio parametrus, buvo keičiamas atstumas tarp dėmių centrų (20, 34, 30 ir 53 μm) ir dėmės spindulys (17, 22 ir 24 μm). Buvo operuojama skirtingos galios (26, 31, 50, 55 ir 62 mW) ir energijos tankio (0,04–0,31 J/cm²) impulsais. Impulsų pasikartojimo dažnis buvo 25 kHz. Iš pradžių buvo naudojami parametrai, apskaičiuoti pagal kiaulių ragenų *ex vivo* abliacijos rezultatus, tačiau, atlikus kalibraciją, jie buvo perskaičiuoti triušių ragenoms. Abliacijos našumo kalibracijai buvo atliekama kiaurinė abliacija. Pamatavus pachimetru (Pocket II, Quantel Medical SA) RCS, buvo skaičiuojama, kiek abliacijos sluoksnių reikėjo iki ragenos prakiūrimo momento.

Narkozei į raumenis buvo suleidžiamas ksilazino hidrochlorido (Xylazine 2 %, Alfasan) bei ketamino hidrochlorido (Bioketan, Vetoquinol) tirpalas. Vietinei nejau-trai buvo lašinami proksimetakaino hidrochlorido 5 mg/ml tirpalo (Alcaine, Alcon) lašai. Epitelis buvo šalinamas mechaniškai. Pirmuosiuose bandymuose deepitelizacijos zoną pažymėdavome standartiniu būdu – mechaniniu žymekliu, vėliau buvo suprogramuotas algoritmas šiai zonai apibrėžti lazeriu. Buvo atliekama įvairaus gylio

miopinė abliacija (20-80 μm) be perėjimo zonų. Po abliacijos buvo įdedamas kontaktinis lęšis („1 - Day Acuvue“ arba „Acuvue Oasys“, Johnson@Johnson).

Trijose akyse buvo atlikta transepitelinė abliacija. Ji buvo stabdoma pagal fluorescencijos pasikeitimą nustatčius, kad pašalintas visas epitelis. Hipermetropinė abliacija taip pat buvo atlikta transepiteliniu būdu.

Keturiems triušiams vienoje akyje buvo atlikta operacija eksimeriniu lazeriu (standartinė FRK), o kitoje – abliacija femtosekundiniais UV impulsais. Pirmosios serijos operacijos buvo atliktos „Technolas 217C“ eksimeriniu lazeriu su „Planoscan“ programine įranga (Bausch & Lomb, Rochester, Niujorkas, JAV). Buvo siekiama abiejose akyse atlikti vienodo gylio $\sim 50 \mu\text{m}$ abliacijas.

Hidracijos eksperimentuose po 40-ies sluoksnių 15 minučių buvo lašinamas SBT ir pachimetru matuojamas RCS, paskui toliau abliuojama iki perforacijos.

Retinoskopu (Elite TM Streak Retinoscope, Welch Allyn) buvo matuojama akių refrakcija (11 akių) ir stebimas jos pokytis iškart po abliacijos. Septyniems triušiams prieš operaciją refrakcijos ir ragenos topografijos analizatoriumi „OPD-Scan II“ (ARK 10000, Nidek) abiejų akių refrakcija buvo pamatuota automatinio būdu ir atlikta ragenų topografija. Aštuoniems triušiams buvo atliktas ragenų topografijos tyrimas prieš operaciją ir įvairiais periodais po operacijos Placido žiedų principu veikinčiu ragenos topografu (TMS2N Topographer, Tomey).

Triušiai buvo stebimi iki 6 mėnesių. Pooperaciniu periodu buvo vertinama epitelizacijos trukmė, subepitelinių drumsčių laipsnis, atliekama pachimetrija (Pocket II, Quantel Medical SA). Buvo atlikti 16 ragenų, paimtų įvairiais periodais po operacijų, histologiniai tyrimai.

3.2. Antroji eksperimentų serija.

Fotorefrakcinės keratektomijos femtosekundiniais ultravioletiniais impulsais eigos ir gijimo baigčių įvertinimas. Palyginimas su fotorefrakcine keratektomija nanosekundiniais ultravioletiniais eksimerinio lazerio impulsais

3.2.1. Lazerinė sistema

Ragenos abliacija buvo atliekama naudojant kietojo kūno lazerio „Pharos-SP“ Yb:KGW pagrindu sukurtą ir trumpiems femtosekundiniams UV impulsams optimizuotą sistemą. Trumpų impulsų modelis buvo pasirinktas dėl jo didesnės maksimalios impulso energijos. Mūsų naudojamos sistemos energija buvo iki 0,6 mJ, esant

kelių kilohercų pasikartojimo dažniui. Didžiausias šio lazerio pasikartojimo dažnis buvo 200 kHz ir vidutinė galia, esant didesniai nei 70 kHz pasikartojimo dažniui, buvo 6 vatai (W). Naudojant autokoreliatorių, buvo išmatuota vidutinė pirmosios harmonikos impulso trukmė, kuri buvo 200 ± 10 fs.

Lazerio pasikartojimo dažnis buvo 5 kHz ir 20 kHz; abiem atvejais, siekiant išlaikyti panašų intensyvumą ir konversijos efektyvumą, tarp lazerio ir penktosios harmonikos generatoriaus buvo instaliuoti skirtingo didinimo teleskopai. UV impulso trukmė tiesiogiai matuota nebuvo, remiantis netiesinių kristalų savybėmis tikėtina vertė yra apie 300 fs. Harmonikų generatoriaus netiesinių kristalų temperatūros stabilumui užtikrinti prieš operaciją lazeriui reikėjo apšilimo, kai harmonikų generatorius veikė nepertraukiamu režimu, uždengus išėjimo pluoštelį. Numanoma galios matavimo paklaida buvo apie 5 %.

Miopinė sferinė abliacija buvo atliekama šalinant skritulio pavidalo didėjančio skersmens ragenos sluoksnius. Vienam sluoksniui pašalinti paviršius buvo skenuojamas keturis kartus: pirmu ėjimu lazerio impulsai buvo sudėliojami vienodu atstumu į stačiakampio formos tinklelio pavidalą ir atstumas tarp dėmių buvo apytikriai lygus dėmės dydžiui. Antru ėjimu toks pat pavidalas buvo perstumiamas x ir y kryptimi per pusę periodo. Trečiu ėjimu pavidalas perstumiamas tik x kryptimi, o ketvirtu – tik y kryptimi. Toks algoritmas padeda išvengti dėmių sanklotos, o tai lemia mažesnę lokalų kaitimą ir lygesnę abliuotą paviršių.

Abliacijos eiga buvo stebima naudojant vaizdo kamerą (CMLN-13S2M, Point Grey Research, Inc.), pritaikius įprastinį arba plyšio pavidalo apšvietimą mažos galios žaliu lazeriu. Plyšio pavidalo ragenos vaizdas buvo stebimas tikruoju laiku kompiuterio monitoriuje bei įrašomas.

Operuojant femtosekundiniais UV impulsais ir nanosekundiniais UV eksimerinio lazerio impulsais, ragenos paviršiaus temperatūros pokyčiams registruoti buvo naudojama infraraudonųjų spindulių kamera (Thermacam S65, FLIR Systems, Inc.). Matuojant temperatūrą, į ragenos paviršiaus spinduliavimo koeficientą neatsižvelgta.

3.2.2. Operacijos aprašymas

Antrosios serijos eksperimentus atlikome su 32 triušiais, sveriančiais 2–4 kg. Gyvūnų amžius buvo 6–16 mėn. Procedūros nurodytos trečioje lentelėje. Triušiai buvo operuojami femtosekundiniu arba eksimeriniu lazeriais, kurių pagrindiniai parametrai nurodyti 4 lentelėje.

3 lentelė. Antrosios serijos procedūros (MMC – mitomicinas C, SBT – subalansuotas druskų tirpalas)

Procedūra	Triušių skaičius
Kalibracija (abi akys)	3
Mažos ir didelės dėmės kontralateralinėse akyse	4
Plyšio pavidalo abliacija, kita akis kontrolinė	2
Gili ir negili abliacija kontralateralinėse akyse	7
Femtosekundiniai UV ir nanosekundiniai UV eksimeriniai impulsai kontralateralinėse akyse	9
Paviršiaus lygumas	1
Miopinė abliacija su hidracija	2
Abliacija su MMC, kita akis su SBT	3
Kontrolinis (vienoje akyje mechaniškai pašalintas epitelis)	1
Iš viso	32

4 lentelė. UV spinduliuotės, naudotos ragenos stromos abliacijai antrosios serijos eksperimentuose, šaltiniai. Eksimerinio lazerio parametrai nurodyti pagal www.fda.gov

Parametrai	Femtosekundinis kietojo kūno lazeris		Eksimerinis lazeris
	Pasikartojimo dažnis	5 kHz	20 kHz
Bangos ilgis	206 nm	206 nm	193 nm
Impulso trukmė	200–300 fs	200–300 fs	18 ns
Pluoštelio profilis ragenos paviršiuje	Gauso	Gauso	plokščias
Vidutinis pluoštelio skersmuo $1/e^2$	$280 \pm 2 \mu\text{m}$	$130 \pm 2 \mu\text{m}$	2 mm
Vidutinė galia po fokusavimo optikos	$200 \pm 5 \text{ mW}$	$180 \pm 5 \text{ mW}$	$235 \pm 5 \text{ mW}^*$
Vidutinis energijos tankis pluošto centre	$0,13 \pm 0,01 \text{ J/cm}^2$	$0,13 \pm 0,01 \text{ J/cm}^2$	$0,12 \text{ J/cm}^2$
Miopinės abliacijos (gylis 30 μm , skersmuo 5mm) trukmė	—	11 s	10 s

Vidurkiai \pm SN (standartinė nuokrypa)

* Matuota naudojant optinės galios matuoklį (Nova II su šiluminės galios jutikliu 10A)

Operacija femtosekundiniais UV impulsais. Prieš narkozę į akį buvo įlašinamas 1 lašas chloramfenikolio ir deksametazono (Oftan dexa-chlora, Santen) tirpalo. Triušiai buvo užmigdomi suleidžiant į raumenis 5 mg/kg ksilazino hidrochlorido (Xylazine 2 %, Alfasan) bei 35 mg/kg ketamino hidrochlorido (Bioketan, Vetoquinol) ir paguldomi į specialiai pagamintą lovą. Išplovus junginės maišą SBT (BSS, Alcon) ir pakirpus blakstienas, buvo užklojama sterili plėvelė. Į akį įlašinus vietinio anestetiko proksimetakaino hidrochlorido 5 mg/ml tirpalo (Alcaine, Alcon), ragenos storis buvo matuojamas pachimetru (Pocket II, Quantel Medical SA). Antrą kartą įlašinus anestetiko, akis buvo imobilizuojama specialiai pagamintu vakuuminio žiedo pavidalo siurbtuku (2 pav.). Skirtingo dydžio triušių akims buvo pagaminti dviejų skersmenų plastikiniai siurbtukų antgaliai. Siurbtukas buvo prisiurbiamas centruojant pagal vyzdį.



2 pav. Triušio akies imobilizacija vakuuminio siurbtuku

Femtosekundiniu lazeriu buvo pažymima 6,5 mm skersmens deepitelizacijos pločio riba ir, epitelį mechaniškai pašalinus mentele, vėl buvo atliekama pachimetrija. Paskui lazeriu „Pharos“ buvo atliekama miopinė stromos abliacija 5 mm optinėje zonoje su 0,5 mm perėjimo zona, siekiant suplokštinti rageną (modeliavome trumparegystės korekciją). Po abliacijos trečią kartą pachimetru buvo matuojamas ragenos storis. Pabaigoje akis buvo išplaunama SBT ir nusausinama steriliu trikampiuku. SBT praplovimui ir sudrėkinimui, kai reikėjo, buvo naudojamas visos operacijos metu.

Po procedūros į akis buvo įtepama chloramfenikolio ir deksametazono tepalo (Oftan Dexa-Chlora, Santen). Akys buvo užklijuojamos steriliu tvarsteliu. Tvarstelis

buvo nuimamas po kelių valandų, kai triušį sugražindavome į vivariumą, tačiau neretai triušiai, atsigavę po narkozės, patys tvarstelį nukrapštydavo. Septynias dienas po operacijos deksametazono ir chloramfenikolio lašai (Oftan Dexa-Chlora, Santen) buvo lašinami 4 kartus per dieną, paskui 3 dienas 2 kartus per dieną.

Eksperimentų, kuriais siekta ištirti kai kurių veiksnių (stomos paviršiaus lygumo, hidracijos, MMC) įtaką gijimui, metodai aprašyti rezultatų skyriuje.

Operacija nanosekundiniais UV eksimerinio lazerio impulsais. Antrosios serijos operacijos buvo atliktos – „Technolas 217z100“ sistema (Technolas Perfect Vision GmbH). Buvo atliekama standartinė žmogui taikoma FRK. Skirtumai nuo procedūros femtosekundiniu lazeriu buvo šie:

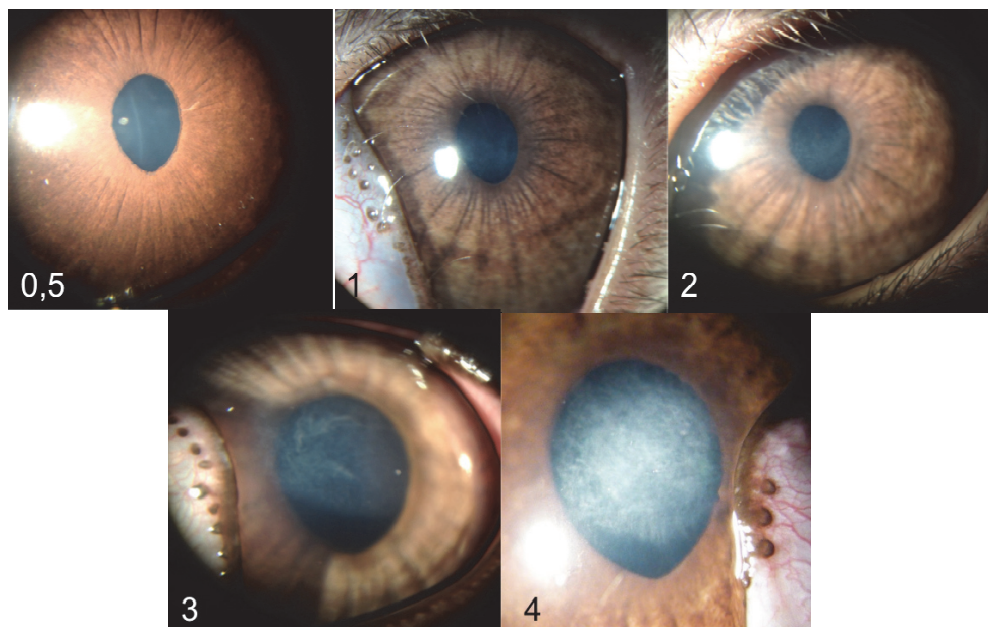
- Akies imobilizacijai nenaudotas prisiurbimas, nes prie komercinės sistemos jo nebuvo įmanoma pritvirtinti. Prietaisas turi akies judesių sekimo pagal rainelę sistemą.
- Deepitelizacijos plotas buvo pažymimas mechaniniu žymekliu.
- Optinė abliacijos zona buvo 5 mm, kaip ir abliuojant femtosekundiniais UV impulsais, bet perėjimo zonos buvo nustatytos gamintojų.

Anestezija, priežiūra pooperaciniu laikotarpiu ir naudoti medikamentai buvo tokie patys, kaip operuojant femtosekundiniu lazeriu.

3.2.3. Pooperacinis stebėjimas ir subepitelinės miglos matavimai

Iki reepitelizacijos pabaigos triušius apžiūrėdavome plyšine lempa ir fotografuodavome kas 1–3 dienas, po to pirmą mėnesį kas savaitę ir vėliau kas mėnesį iki 6 mėnesių. Apžiūros metu triušiai nemigdyti. Nuo pirmos savaitės po apžiūros plyšine lempa buvo atliekama pachimetrija sukėlus nejautrą vietiniu anestetiku proksimetakaino hidrochloridu. Atliekant pachimetriją buvo stengiamasi matuoti drumsties (jeigu ji buvo matoma plika akimi) arba ragenos centre.

Ragenų subepitelinė migla buvo vertinama biomikroskopuojant plyšine lempa. Subepitelinės miglos laipsnis buvo vertinamas pagal Fanteso ir kt. (Fantes, Hanna et al. 1990) skalę. Pagal šią skalę subepitelinė migla 0 yra visiškai skaidri ragena; subepitelinė migla 0,5 yra vos įžiūrima drumstis, atidžiai stebint įstrižu apšvietimu; subepitelinė migla 1 yra kiek didesnė drumstis, netrukdanti įžiūrėti smulkių rainelės detalių; subepitelinė migla 2 yra švelnus rainelės detalių neryškumas; subepitelinė migla 3 yra vidutinis rainelės ir lęšiuko vaizdo neryškumas; ir subepitelinė migla 4 yra visiškas stomos drumstumas abliacijos vietoje (3 pav.).

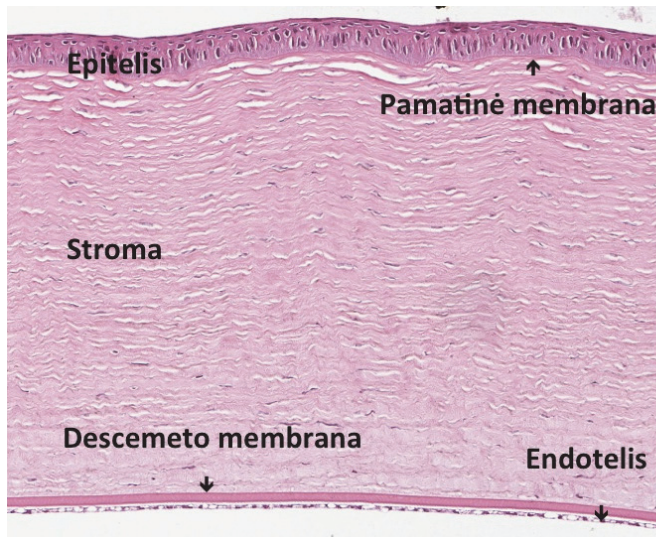


3 pav. Triušių ragenų subepitelinės miglos pavyzdžiai. Drumsties laipsnis nurodytas pagal Fanteso (Fantes, Hanna et al. 1990) skalę

3.2.4. Histologiniai tyrimai

Po triušių eutanazijos jų akių obuoliai buvo enukleuojami ir fiksuojami 10 % neutraliame buferiniame formalino tirpale. Šiame tirpale akių obuoliai buvo laikomi dvi dienas kambario temperatūroje. Paskui buvo atliekami pjūviai per regos nervą ir ragenos centrą, audiniai dehidruojami ir impregnuojami parafinu automatiniam audinių procesoriuje. Paruošti centriniai 5 μm storio preparatai buvo dažomi hematoksilinu ir eozinu (HE). Audinių preparatai buvo tiriami šviesos mikroskopu. Nudažyti HE preparatai buvo nuskenuojami skeneriu (Scanscope GL Slide Scanner, Aperio Technologies, Inc.), taikant 20 kartų didinimą, ir tiriami naudojant atitinkamą skaitmeninį didinimą. Pakitimai buvo vertinami lyginant su kontroline ragena (4 pav.).

Dvi ragenos po abliacijos femtosekundiniais UV impulsais buvo tirtos transmissinės elektroninės mikroskopijos (TEM) metodu. Osmio tetraoksido ir tanino rūgštyje fiksuoti audiniai buvo dehidruojami serijiniu būdu etanolyje ir įliejami į epoksidinę dervą eponą. Audiniai buvo padalijami į pusiau plonus segmentus ir dažomi toluidino mėliu O. Paskui preparatai buvo supjaustomi į plonus 70–100 nm segmentus, dažomi uranilacetatu ir švino citratu ir tiriami Morgagni-268D mikroskopu (TEM, FEI Co.).



4 pav. Normali triušio ragena (kontrolinė akis).
Šviesos mikroskopija

3.2.5. Statistinė duomenų analizė

Subepitelinės miglos statistinė analizė buvo atlikta, naudojant „Statistica“ programinę įrangą (versija 8.0, Statsoft, Inc.). Dviejų skirtingai abliuotų (femtosekundiniais UV impulsais ar nanosekundiniais UV eksimeriniais impulsais) imčių palyginimui taikytas neparametrinis Mann–Whitney testas. P reikšmė $<0,05$ buvo pasirinkta siekiant nustatyti, ar šiose grupėse subepitelinė migla skyrėsi. Grafikuose parodytas vidutinis subepitelinės miglos dydis su vidurkio standartine paklaida.

3.3. Trečioji eksperimentų serija.

Transepitelinė abliacija optimizuotais didesnės vidutinės galios femtosekundiniais ultravioletiniais impulsais.

Palyginimas su abliacija nanosekundiniais ultravioletiniais eksimerinio lazerio impulsais

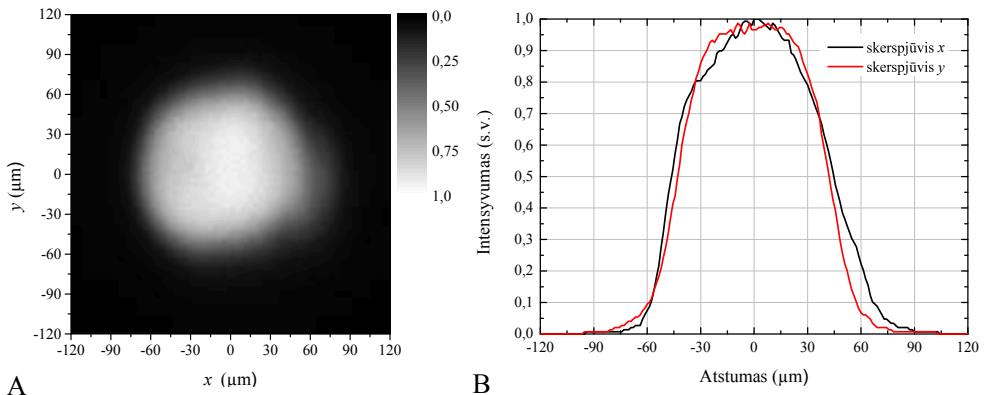
3.3.1. Femtosekundinė lazerinė sistema

Siekiant padidinti stromos abliacijos našumą ir pagreitinti abliacijos procesą, lazerinė sistema buvo modifikuota:

- Lazerio režimas pakeistas į standartinį (impulso trukmė 280 ± 10 fs). Tai leido padidinti fundamentaliosios lazerio spinduliuotės (1030 nm) vidutinę galią iki

5 W esant 50 kHz pasikartojimo dažniui ir atitinkamai vidutinę UV spinduliuotės galią iki 400 mW.

- Vietoj Gauso impulso profilio buvo suformuotas supergausinis (5 pav). Pluoštelio skersmuo buvo $115 \pm 5 \mu\text{m}$ ($1/e^2$).
- Greitesni galvanometro skeneriai (hurrySCAN II7, Scanlab AG) leido sumažinti energijos praradimą skenuojant pluoštelį.
- Padidinus pasikartojimo dažnį nuo 20 kHz iki 50 kHz, UV impulso energijos tankis išliko panašus kaip ankstesniuose eksperimentuose – $135 \pm 5 \text{ mJ/cm}^2$.
- Padidėjus pasikartojimo dažniui, buvo pakeistas skenavimo algoritmas, siekiant, kad abliuotas paviršius mažiau kaistų ir būtų lygesnis. Miopinė TransFRK buvo atliekama šalinant skritulio pavidalo ragenos sluoksnius. Kiekvienas sluoksnis buvo formuojamas iš 5 posluoksnių, skenuojant rastru. Atstumas tarp gretimų raistro linijų posluoksnyje buvo $275 \mu\text{m}$, o tarp gretimų taškų raistro linijoje – $55 \mu\text{m}$. Kiekvienas posluoksnis buvo perstumtas x ir y kryptimi per $55 \mu\text{m}$. Sluoksniai buvo sukami vienas kito atžvilgiu. Skenuojant šiuo būdu, karštis migruoja gilyn į rageną ir statmenai raistro linijai, o prarastų lazerio impulsų kiekis lieka minimalus, todėl audiniai kaista mažiau. Kaitimą mažino ir tai, kad abliacijos sluoksniai buvo skirtingo skersmens: po mažiausio skersmens sluoksnio sekė didžiausio skersmens sluoksnis, ir taip toliau, kol abliacijos pabaigoje sluoksnių skersmenys susilygino.



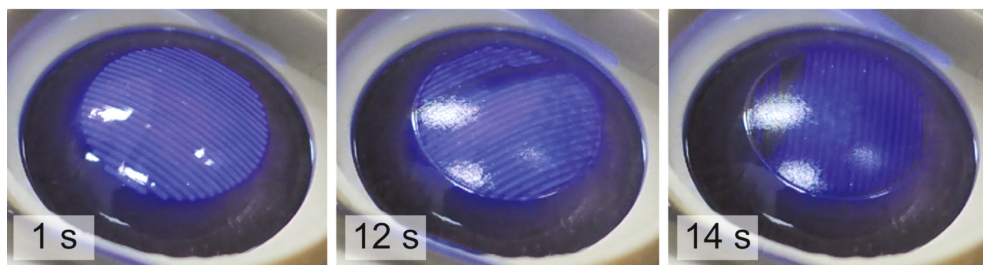
5 pav. UV pluoštelio vaizdas abliacijos plokštumoje (A) ir intensyvumo pasiskirstymas x ir y ašyse (B)

3.3.2. Procedūros

Atlikti eksperimentai su 33 pigmentuotais triušiais, kurių amžius buvo 3– 6 mėnesiai, ir svoris 1,3–3,2 kg. Buvo atlikta abliacijos našumo kalibracija ir trijų tipų ragenos abliacijos: nepertraukiama TransFRK femtosekundiniais UV impulsais, transepitelinė abliacija nanosekundiniais UV eksimeriniais impulsais ir modifikuota TransFRK femtosekundiniais UV impulsais.

3.3.2.1. Abliacijos našumo kalibracija

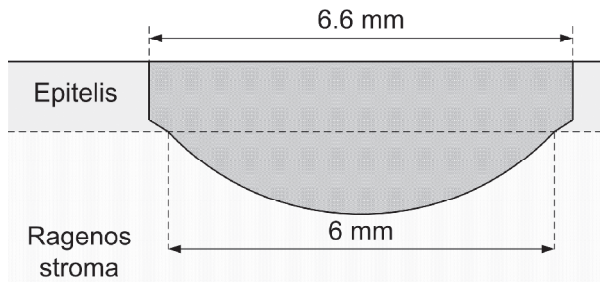
Siekiant nustatyti, kiek audinio pašalinama vienu skenavimo sluoksniu ir kiek epitelio sluoksnių reikia pašalinti, dviejose dviejų triušių akyse buvo atlikta miopinė 190 skenavimo sluoksnių abliacija transepiteliniu būdu be pertraukų. Šalinant epitelį ne mechaniškai, o lazeriu, svarbu žinoti epitelio storį, tačiau galimybės pamatuoti kiekvienos ragenos epitelio storio prieš operaciją neturėjome. Abliacijos eigą filmavome vaizdo kamera, ir epitelio pašalinimo momentą vertinome pagal mėlynos fluorescencijos pasikeitimą (Tuft, al-Dhahir et al. 1990; Korkmaz, Bilgihan 2014) (6 pav.). Sprendžiant pagal fluorescenciją, epitelis buvo visiškai pašalintas po 64 skenavimo sluoksnių ir tai sudarė 45% nuo 110 μm gylio abliacijos. Remiantis literatūros duomenimis (1 lentelė), triušių ragenų centrinis epitelio storis yra 32,2–47,7 μm (Li, Petroll et al. 1997; Jester, Li et al. 1998; Masters 1998; Reiser, Ignacio et al. 2005; Petroll, Weaver et al. 2013). Tai rodo, kad mūsų eksperimentuose epitelio abliacijos našumas buvo $\sim 0,6$ μm skenavimo sluoksniui.



6 pav. Epitelio mėlynos fluorescencijos kitimas nepertraukiamos TransFRK femtosekundiniais UV impulsais metu. Pradžioje fluorescuoja visas plotas, 12-ą sekundę atsiranda nefluorescuojančių vietų, kurios plečiasi. Nefluorescuojančiose vietose epitelis jau pašalintas. Netolygi paviršiaus spalva rodo, kad epitelio storis nebuvo vienodas

3.3.2.2. Nepertraukiama TransFRK femtosekundiniais UV impulsais

Monolateralinę nepertraukiamą ~110 µm gylio TransFRK 6,6 mm plote su 6 mm optine zona optimizuotais didelės galios femtosekundiniais UV impulsais atlikome 20 triušių. Abliacijos profilis parodytas 7 pav. Epitelio abliacijos kraštai buvo „šulinio“ pavidalo, o lęšis buvo formuojamas stromoje. Atsižvelgdami į epitelio storį, apskaičiavome, kad miopinės abliacijos gylis stromoje turėtų būti 60–80 µm, o 70 µm gylio abliacija 6 mm optinės zonos centre suformuoja ~5,0 D pokyti.



7 pav. Nepertraukiamos TransFRK abliacijos femtosekundiniais UV impulsais profilis

Operacijos eiga ir pooperacinis stebėjimas nuo antrosios serijos eksperimentų skyrėsi tuo, kad:

- buvo atliekama transepitelinė abliacija, t.y. epitelis buvo šalinamas ne mechaniškai, kaip ankstesnėse serijose, o lazeriu;
- pachimetrija buvo atliekama du kartus: prieš abliaciją ir po jos. Pašalinus epitelį pachimetrija nebuvo daroma, nes nebuvo stabdoma procedūra;
- prieš abliaciją nebuvo lašinama antibiotikų ir steroidų lašų. Po operacijos dekametazono/chloramfenikolio (Oftan dexta-chloro, Santen) lašai buvo lašinami penkias dienas 4 kartus per dieną, įskaitant operacijos dieną.

3.3.2.3. Transepitelinė abliacija nanosekundiniais eksimeriniais UV impulsais

Komerciniu eksimeriniu lazeriu (Technolas 217z100, Technolas Perfect Vision GmbH) operavome 11 triušių 12 akių. Iš jų vienam triušiui išoperavome abi akis ir iškart po eutanazijos atlikome enukleaciją bei atidavėme histologiniams tyrimams,

norėdami įvertinti abliuoto paviršiaus lygumą. Likusiems triušiams buvo operuota po vieną akį.

Procedūra nuo femtosekundinės skyrėsi tuo, kad, pirma, buvo naudojamas vokų skėtiklis ir, antra, abliacijos metu judesių stabilizacijai nebuvo naudojamas vakuuminis prisiurbimas, o akių judesiai buvo sekami „Technolas 217z100“ lazeryje įmontuota standartine sistema. Lazerio pasikartojimo dažnis buvo 50 Hz, energijos tankis $120 \pm 5 \text{ mJ/cm}^2$, impulso trukmė 18 ns ir dėmės skersmuo 2 mm.

Siekdami, kad abliacijos profilis būtų panašus į taikytą abliacijos femtosekundiniais UV impulsais metu, t. y. lęšis formuojamas stromoje, epitelį 6,6 mm zonoje šalinome fototerapinės keratektomijos (FTK) režimu. FTK režimas epiteliumi šalinti buvo pasirinktas todėl, kad tokios abliacijos metu audiniai šalinami neformuojant refrakcijos pokyčio. Procedūra vyko gamintojų suprogramuotu režimu, kurio pakeisti negalima. Suprogramavome 55 μm gylio FTK, kuri yra gilesnė nei vidutinis triušio epitelio storis, ir planavome procedūrą sustabdyti, kai mikroskopu bus pastebėtas stromos paviršius. Fluorescencija apšviestoje operacinėje matėsi sunkiai, tačiau vaizdo įrašuose buvo aiškiai matomas jos pasikeitimas. Stromos miopinė abliacija buvo atliekama pagal „PlanoScan“ algoritmą, nustačius 70 μm gylį. Pagal „PlanoScan“ algoritmą abliuojama 2 mm skersmens pluošteliu su plokščia viršūne, skaičiuojama naudojant standartinį, o ne individualų, keratometrijos dydį (43,3 D) ir formuojamos platesnės perėjimo zonos (Hashemi, Nazari et al. 2010). Pachimetrija buvo atliekama prieš abliaciją, pašalinus epitelį ir po stromos abliacijos. Po stromos abliacijos pachimetriją atlikti buvo įmanoma tik sudrėkinus daviklio viršūnę SBT tirpalu.

Laikantis gamintojo programos procedūra buvo dažnai stabdoma: FTK metu buvo septynios pertraukos po ~ 2 s, lazerio parametrų derinimas po FTK užtruko ~ 3 minutes, ir stromos abliacijos metu buvo trys pauzės po ~ 2 s.

3.3.2.4. Modifikuota TransFRK femtosekundiniais UV impulsais

Ši procedūra atlikta siekiant suvienodinti abliacijos nanosekundiniais UV eksimerinio lazerio impulsais ir femtosekundiniais UV impulsais sąlygas, nes vidutinis abliacijos eksimeru gylis buvo $151,4 \pm 19,7 \mu\text{m}$ vietoje planuoto 110 μm (paašškinta Rezultatų 5.2.1 skyriuje). Operacija atlikta penkiems triušiams praėjus 2,5 mėnesio po monolateralinės abliacijos eksimeriniu lazeriu kontralateralinėse akyse. Modifikacijomis siekiame atkartoti eksimero procedūrą: pirma, nustatėme 150 μm TransFRK gylį; antra, abliacija buvo atliekama su pauzėmis, kurių trukmė atitiko eksimero procedūros metu pamatuotas pertraukas. Buvo pagilinta ne epitelio, o stromos

abliacija, nes epitelio fluorescencijos pasikeitimas aiškiai rodė, kada baigėsi epitelio abliacija. Be to, pachimetrijos matavimai po savaitės ragenose su ataugusiu epiteliu rodė, kad eksimero procedūros metu buvo pašalinta daugiau stromos, o ne epitelio audinių. Dar viena priežastis negilinti epitelio abliacijos buvo ta, kad pagal nustatytą profilį epitelis buvo abliuojamas su stačiais kraštais perėjimo zonoje (7 pav.), o eksimeriniu lazeriu formuojami nuožulnūs kraštai. Jei būtume gilinę epitelio abliaciją, paviršiuje būtų susiformavęs gilus „šulinys“, o dėl stačių kraštų gali sutrikti reepitelizacija ir atsirasti intensyvesnė subepitelinė migla (Serrao and Lombardo 2005).

Pachimetrija buvo atliekama prieš abliaciją, pašalinus epitelį ir po stromos abliacijos (kaip ir eksimero procedūros metu). Po stromos abliacijos, skirtingai nei abliuojant eksimeriniais impulsais, ragenos storį buvo galima pamatuoti nesudrėkinus daviklio.

Dar trims triušiams, pasibaigus 6 mėnesių stebėjimo laikotarpiui po femtosekundinės abliacijos, modifikuota TransFRK buvo atlikta anksčiau neoperuotose akyse, siekiant įvertinti paviršiaus lygumą. Visos trys akys iškart po operacijos ir eutanazijos buvo enukleuotos ir paruoštos histologiniam ištyrimui.

3.3.3. Pooperacinis stebėjimas

Gyvūnai po abliacijos femtosekundiniais UV impulsais buvo stebimi iki 6 mėnesių (5 lentelė). Žinoma, kad po eksimerinės abliacijos intensyviausia subepitelinė migla būna po mėnesio (Mohan, Hutcheon et al. 2003), o taip pat ir mūsų antrosios serijos eksperimentais buvo nustatyta, kad subepitelinė migla po abliacijos femtosekundiniais UV impulsais maksimumą pasiekia po mėnesio, todėl akys po modifikuotos TransFRK femtosekundiniais UV impulsais buvo stebimos 4 savaites.

Po abliacijos nanosekundiniais UV eksimerinio lazerio impulsais penkios akys buvo stebimos 4 savaites ir penkios – 2 mėnesius.

5 lentelė. Stebėjimo laikotarpiai po abliacijos didelės galios femtosekundiniais UV impulsais

Triušių skaičius	Stebėjimo laikotarpis
1	<1 savaitės
2	1–3 savaitės
9	4 savaitės
2	4 mėnesiai
1	5 mėnesiai
5	6 mėnesiai

Ragenos buvo apžiūrimos plyšine lempa ir fotografuojamos. Subepitelinė migla buvo vertinama kas savaitę iki mėnesio ir vėliau kas mėnesį. Po apžiūros proksimeta-kaino hidrochlorido lašų nejaunos sąlygomis buvo atliekama pachimetrija.

3.3.4. Histologiniai tyrimai

Abliuoto paviršiaus lygumas buvo vertinamas iškart po abliacijos enukleuotose penkiose akyse: dviejose po abliacijos nanosekundiniais UV eksimerinio lazerio impulsais ir trijose po modifikuotos TransFRK femtosekundiniais UV impulsais.

Po penkias ragenas, abliuotas trimis skirtingais būdais, histologiniams tyrimams buvo paimta po mėnesio ir ištirta pirmiau aprašytu būdu (žr. sk. 3.2.4).

4. DARBO REZULTATAI

4.1. Pirmosios eksperimentų serijos rezultatai

Ragenos abliacijai mažos dėmės impulsais labai svarbu, kad akis procedūros metu nejudėtų, todėl sukūrėme triušio ir jo akies imobilizacijos būdą. Iš pradžių bandėme imobilizuoti triušį stereotaksio aparatu, vėliau buvo pagamintas specialus triušio įtvaras (judanti operacinė lova) su mobilia lentyna galvai ir sukonstruoti vakuuminiai plastikiniai žiedo pavidalo siurbtukai (dviejų skersmenų skirtingų dydžių akims), prisiurbiantys rageną periferijoje ir stabiliai įtvirtinantys akį (2 pav).

Buvo sukurtas skenavimo algoritmas deepitelizacijos plotui apibrėžti femtosekundiniu lazeriu. Tai nekontaktinis, tikslesnis (formuojamas pageidaujamo skersmens taisyklingas apskritimas) ir sterilesnis būdas, nei apibrėžimas mechaniniu žymekliu.

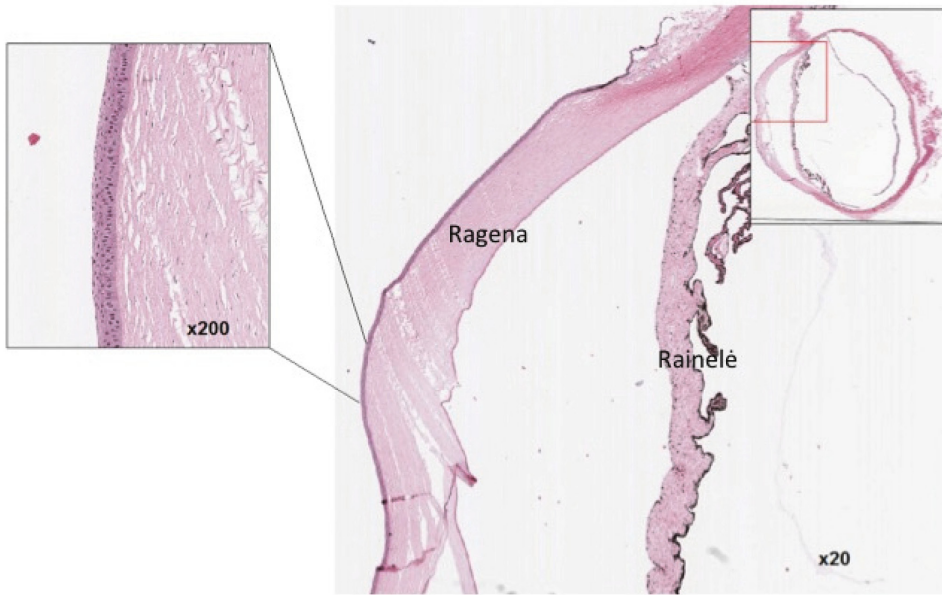
Žmogui po FRK dedamas kontaktinis lęšis, nes jis mažina skausmą ir greitina ragenos reepitelizaciją. Kontaktinis lęšis pašalinamas, kai ragena visiškai epitelizuojasi. Nė vienam mūsų eksperimentiniam triušiui nepavyko išlaikyti lęšio akyje iki reepitelizacijos pabaigos – dažniausiai lęšis iškrisdavo jau pirmą dieną, kartais rasdavome akyje susilenkusį lęšį, todėl nutarėme kontaktinių lęšių nebenaudoti.

Refrakciją retinoskopu buvo lengva pamatuoti prieš operaciją, tačiau iškart po abliacijos sunku buvo įvertinti retinoskopinio šešėlio judesį, manome, dėl ragenos paburkimo. Pooperaciniu periodu refrakcijos vertinimui trukdė drusmtys. Dėl šių priežasčių refrakcijos tyrimo atsisakėme kaip netikslaus.

OPD skeneriu nustatėme, kad 14 ištirtų ragenų laužiamoji geba buvo $44,92 \pm 1,01$ D, t. y. panaši į žmonių, kurių šis dydis yra $43,78 \pm 1,86$ D (Sayegh 1996).

Ragenos topografijos tyrimų vėliau atsisakėme, nes triušiai nežiūri į fiksacijos tašką, todėl be narkozės sunku šiuos tyrimus atkartoti toje pačioje ragenos vietoje ir nustatyti skirtumus prieš ir po operacijos.

Atlikę kontrolinę operaciją, nustatėme, kad vien vakuuminis akies prisiurbimas ir mechaninis epitelio pašalinimas be abliacijos subepitelinės miglos nesukėlė, histologiniame preparate patologinių pakitimų nebuvo (8 pav.).

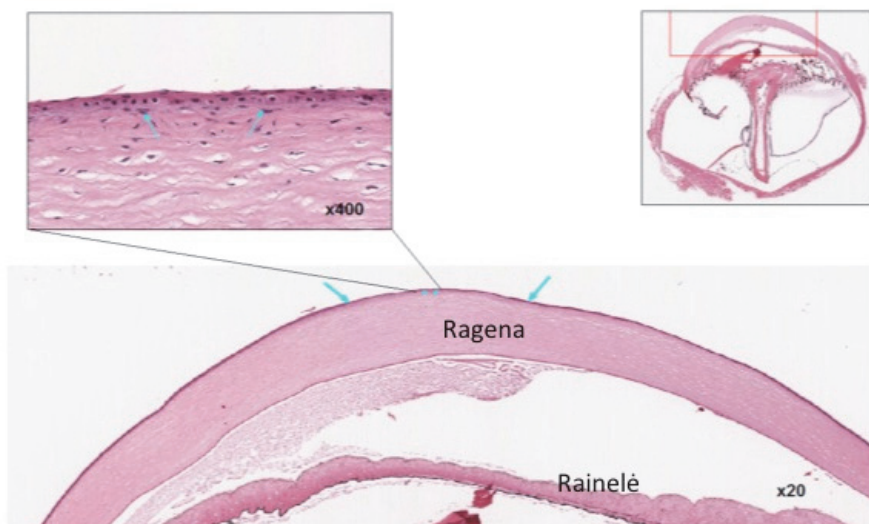


8 pav. Triušio akies histologinis vaizdas praėjus 5 mėnesiams po mechaninio epitelio pašalinimo ir vakuuminio prisiurbimo be abliacijos. Ragenos stromos ir epitelio patologiinių pakitimų nerasta. Šviesos mikroskopija

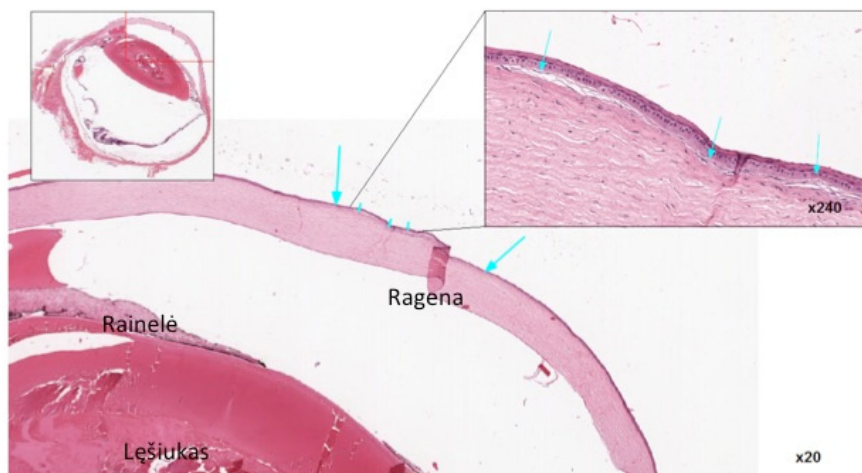
Vienoje akyje pabandėme ir įsitikinome, kad femtosekundiniais UV impulsais galima atlikti hipermetropinę abliaciją, tačiau šios procedūros optimizacija galėtų būti jau kito darbo tikslas.

Atlikę bandomąsias operacijas eksimeriniu lazeriu, įvertinome skirtingais impulsais atliekamų procedūrų skirtumus ir kiek įmanoma suvienodinome operacijų protokolus pagrindiniams eksperimentams. Pirmasis mūsų operuotas triušis, kuriam dešiniąją akį operavome femtosekundiniu, o kairiąją po 3 savaičių eksimeriniu lazeriu, padvėsė nuo infekcijos 17-ą dieną po antrosios operacijos. Infekcija prasidėjo nuo eksimeriniu lazeriu operuotos akies keratito, nors gali būti, kad keratitas buvo bendros infekcijos simptomas. Dviejų triušių femtosekundiniu lazeriu operuotos akys sugijo skaidriau nei operuotos eksimeriniu. Trečiojo gyvūno mažiau drumstėjo eksimeriniu lazeriu operuota akis. Nepateikiame subepitelinų drumsčių laipsnio objektyvaus kiekybinio palyginimo, nes dar nebuvo standartizuotos operacijų ir gijimo baigčių vertinimo sąlygos.

Po operacijų femtosekundiniais UV impulsais histologiniuose preparatuose buvo stebima subepitelinė fibrozė, židininė epitelio atrofija (9 pav.) arba hiperplazija. Panašūs pakitimai rasti ir eksimeriniais UV impulsais operuotose akyse (10 pav).



9 pav. Triušio akies histologinis vaizdas praėjus 2 mėnesiams po operacijos femtosekundiniu lazeriu. Židininė ragenos epitelio atrofija centrinėje dalyje su lokalia fibroblastų poepiteline proliferacija (rodyklės). Šviesos mikroskopija



10 pav. Triušio akies histologinis vaizdas po mėnesio po operacijos eksimeriniu lazeriu. Židininė ragenos epitelio edema centrinėje dalyje su lokalia fibroblastų poepiteline proliferacija (rodyklės). Šviesos mikroskopija

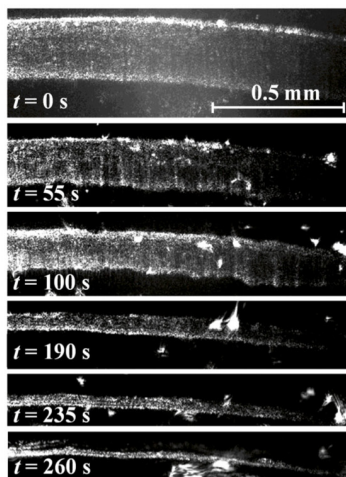
Ekspertimentų metu buvo nustatytas operacijos ir pooperacinio sekimo protokolas, atrinkti tinkami ir mums prieinami ragenų gijimo vertinimo metodai. Buvo sukurtas skenavimo būdas, apskaičiuotas abliacijos našumas triušio audiniuose.

Įsitikinome, kad femtosekundiniais UV impulsais galima atlikti ragenos abliaciją ir gijimas vyksta panašiai kaip eksimeriniais impulsais operuotose akyse. Nors abliaciją atlikti pavyko, tačiau efektyvesnei procedūrai lazerio galia ir energijos tankis buvo per maži. Tapo aišku, kad turi būti padidinta lazerio galia. Tai buvo padaryta patobulinus lazerį ir optimizavus lazerio parametrus antroje eksperimentų serijoje.

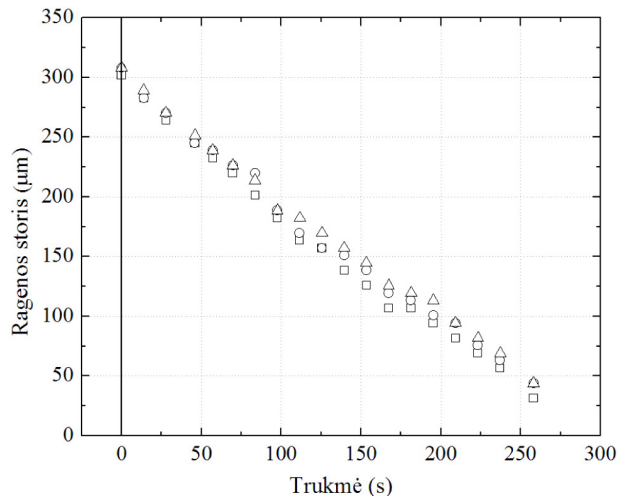
4.2. Antrosios eksperimentų serijos rezultatai

4.2.1. Abliacijos našumo kalibracija

Antrosios serijos eksperimentai buvo atlikti didesnės galios UV impulsais, todėl reikėjo iš naujo apskaičiuoti abliacijos našumą. Abliacijos našumo kalibracija atlikta šešiose akyse siekiant nustatyti, kiek audinio pašalinama vienu sluoksniu, o taip pat įvertinti abliacijos nuspėjamumą. Pašalinus epitelį, 6 mm skersmens plote buvo atliekama „šulinio“ pavidalo abliacija iki ragenos perforacijos. Abliacijos našumas buvo stabilus, t.y. pašalinto audinio kiekis per laiko vienetą nesikeitė ir ragenos storis laike kito pagal linijinę funkciją (11 pav.). Procedūros pabaigoje ragena buvo tolygiai suplonėjusi iki kelių dešimčių mikrometrų. Buvo nustatyta, kad vienu sluoksniu buvo pašalinama $1,25 \pm 0,04 \mu\text{m}$ audinio.



A



B

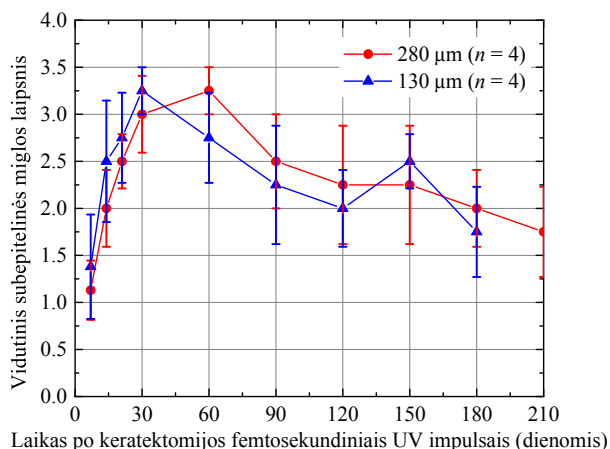
11 pav. Stromos abliacijos dinamika (femtosekundiniai UV impulsai, pasikartojimo dažnis 20 kHz, vidutinė galia 180 mW, energijos tankis $0,13 \text{ J/cm}^2$.) Kadrai iš vaizdo įrašo rodo ragenos pjūvius abliacijos metu (A). (B) Ragenos storio kitimas laike, apskaičiuotas pagal vaizdo įrašus

4.2.2. Abliacijos trukmė

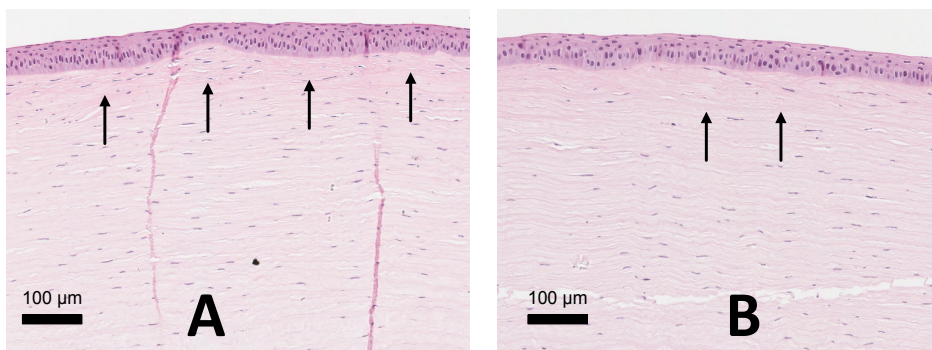
Viena trumparegystės dioptrija, kai pasikartojimo dažnis buvo 20 kHz ir optinė zona 5 mm, buvo pašalinama per 3,7 s. Miopinės 30 µm abliacijos femtosekundiniais UV impulsais trukmė buvo apie 11 s, t.y. panaši į abliacijos mūsų naudotu eksimeriniu lazeriu, atliekamos su pertraukomis pagal gamintojų nurodymus, trukmę (10 s) (4 lentelė).

4.2.3. Dėmės dydžio ir impulsų pasikartojimo dažnio pasirinkimas

Lazerine sistema „Pharos“, naudota šiame eksperimente, galima modeliuoti įvairius pasikartojimo dažnius ir impulso energiją. Didžiausia impulso energija gaunama, kai pasikartojimo dažnis mažesnis nei 5 kHz. Mes palyginome skirtingo pasikartojimo dažnio ir skirtingo dydžio dėmių poveikį ragenos paviršiaus abliacijos kokybei ir gijimo eigai. Impulso energijos tankis buvo pasirinktas panašus į mūsų naudoto eksimerinio lazerio ($E = 0,13 \text{ J/cm}^2$), o pasikartojimo dažniai buvo 5 kHz ir 20 kHz esant atitinkamiems dėmių dydžiams 280 µm ir 130 µm. Keturiems triušiams atlikome gilią miopinę 130 µm (apie 13,0 D) abliaciją (keratektomiją) su skirtingais dėmių dydžiais dešiniojoje ir kairiojoje akyse. Operacijos buvo atliktos su 3–4 savaitių pertrauka, ir triušių gijimą stebėjome 6 mėnesius. Abliacija buvo gili, todėl susiformavo intensyvi subepitelinė migla, kuri po 6 mėnesių praskaidrėjo, tačiau neišnyko (12 pav.). Subepitelinės miglos laipsnis ragenose po abliacijos skirtingo dydžio dėmėmis statistiškai nesiskyrė ($p=0,1$). Visuose patohistologiniuose preparatuose rasti minimalūs mikrožidininiai poepitelinės stromos fibroziniai pakitimai (kompaktiškesnė stroma, nevienodai orientuotos ir netaisyklingai išsidėsčiusios kolageno skaidulos) su galima epitelio edema. Stromos nelygumus išlygino regeneravęs epitelis (13 pav.). Nenustatę skirtumų tarp paviršių lygumo, gijimo eigos ir baigčių abiem būdais operuotose akyse, tolesniems eksperimentams pasirinkome 130 µm dydžio dėmes su 20 kHz pasikartojimo dažniu. Kai pasikartojimo dažniai didesni, gaunama didesnė vidutinė lazerio pluošto galia, todėl pakanka kompaktiškesnio ir pigesnio lazerio.



12 pav. Subepitelinės miglos dinamika po gilios abliacijos (130 μm) femtosekundiniais UV impulsais skirtingo dydžio dėmėmis (n=akių skaičius)

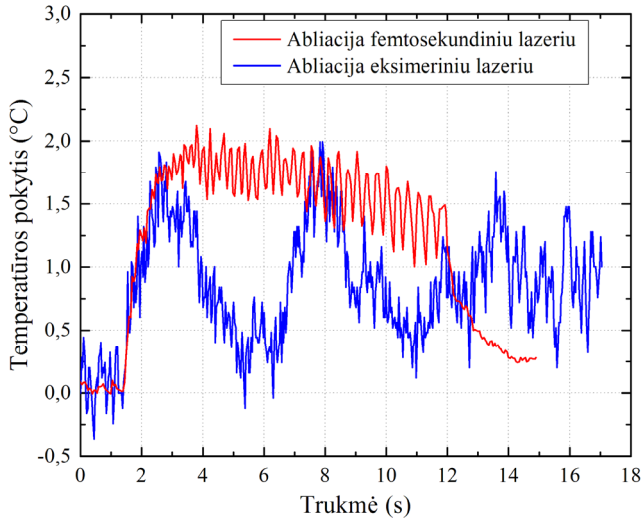


13 pav. Ragenos po abliacijos (130 μm, apie 13,0 D) skirtingo dydžio dėmėmis: (A) 280 μm, po 7 mėnesių ir (B) 130 μm, po 6 mėnesių). Rodyklėmis pažymėtas subepitelinės fibrozės sluoksnis. Matyti, kaip ataugęs epitelis išlygina stromos paviršiaus nelygumus (A). Šviesos mikroskopija

4.2.4. Ragenos paviršiaus temperatūra

Stromos abliacijos femtosekundiniais UV impulsais (30 μm) metu temperatūra maksimaliai buvo pakilusi praėjus 3,5 s nuo procedūros pradžios ir maksimalus pakilimas siekė 2° C (14 pav., raudona linija). Maksimalus pakilimas stebėtas ~1,5 s vėliau nei eksimerinės abliacijos metu. Procedūros pradžioje pagal miopinės korekcijos skenavimo algoritmą ragena buvo abliuojama mažame plote centre, todėl šiluma kaupėsi šiame plotelyje. Abliuojant kitus sluoksnius, didėjo abliuojamo paviršiaus plotas, ir tas pats šilumos kiekis per laiko vienetą skirstėsi vis didėjančiame plote, todėl ragenos paviršiaus temperatūra krito, o maksimali temperatūra, kaip minėta, buvo pasiekta procedūros pradžioje. Nepertraukiama abliacija užtruko 12 s.

Abliacijos eksimeriniu lazeriu (30 μm) metu ragenos paviršiaus temperatūra pakilo irgi 2 $^{\circ}\text{C}$ (14 pav., mėlyna linija). Pagal gamintojų protokolą lazeris kas 5 s buvo išjungiamas 2,5 s periodui, todėl 14 pav. matome banguotą temperatūros kitimo kreivę. Abliacija eksimeriniu lazeriu su pertraukomis užtruko 20 s.

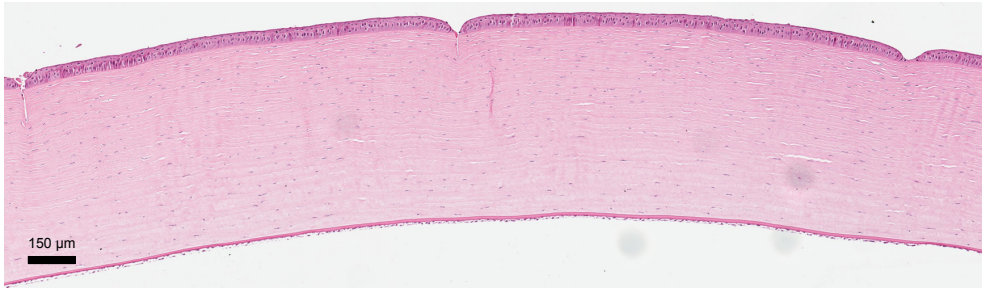


14 pav. Paviršiaus temperatūros dinamika stromos abliacijos metu. Vaizduojami matavimai karščiausiam taške, kuris buvo abliacijos centre

4.2.5. Plyšio pavidalo abliacija

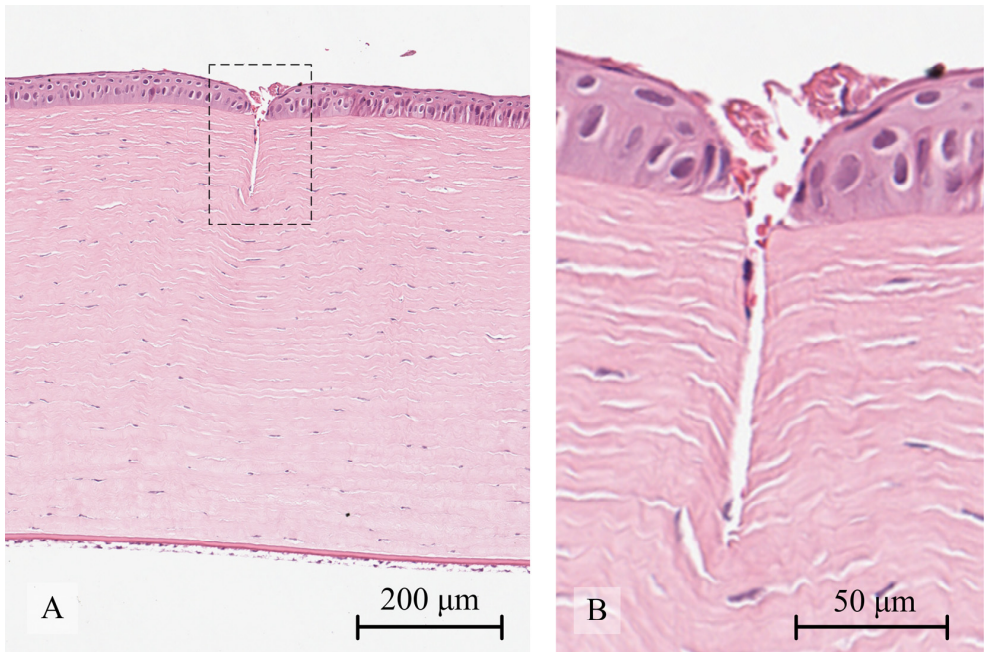
Dviejose skirtingų triušių akyse atlikome plyšio pavidalo 100 μm , 200 μm ir 250 μm gylio įpjovas femtosekundiniais UV impulsais, nes norėjome ištirti terminį poveikį, t. y. patikrinti, ar ragenose neatsiranda nudegimo požymių. Femtosekundinio lazerio spindulys buvo skenuojamas statmenai ragenai išilgine linija nepašalinus epitelio. Skenuojant viena linija tarp sluoksnių buvo daromos 0,5 s trukmės pauzės, siekiant išlaikyti panašią temperatūrą, kaip atliekant didelio diametro (5 mm) abliaciją. Kontralateralinės šių triušių akys buvo paliktos kontrolei: vienoje nedaryta nieko, kitoje – tik mechaniškai pašalintas epitelis. Iškart po procedūros akys buvo enukleuotos ir atlikti histologiniai tyrimai.

Įdomu, kad plyšių gylis histologiniuose preparatuose atrodo mažesnis, negu buvo apskaičiuota. Triušio epitelio storis yra apie 40 μm , o 100 μm gylio pjūvis net neprakirto epitelio (15 pav.). Manome, kad taip gali būti dėl šių priežasčių: pirma, epitelio abliacijos našumas gali būti mažesnis nei stromos, o gylis buvo apskaičiuotas pagal stromos duomenis ir, antra, ruošiant histologinius preparatus, ragena deformuojasi ir paburksta.



15 pav. Ragena iškart po plyšio pavidalo incizijų femtosekundiniais UV impulsais. Numatytas įpjovų gylis: 250 μm, 200 μm ir 100 μm. Šviesos mikroskopija

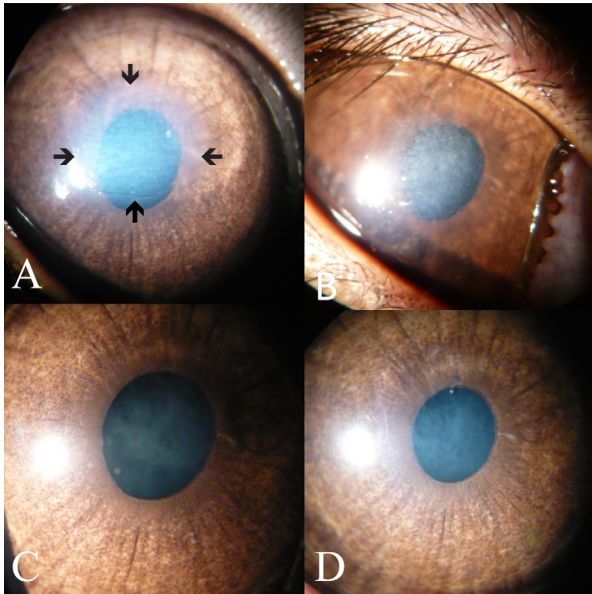
Histologiniuose preparatuose (16 pav.) matyti, kad pjūviai epitelyje yra lygiais kraštais, lygiai perpjautos net epitelio ląstelės (16 pav., B). Pjūviai stromoje yra „V“ raidės pavidalo, be nudegimo požymių. Tarp pjūvio kraštų viršutinėje dalyje matomos epitelio liekanos. Likusių epitelio ląstelių ir keratocitų branduoliai atrodo nepažeisti. Kolageno skaidulos išsidėsčiusios taisyklingai, tik pjūvio apčioje šiek tiek įlinkusios. Gilesniuose sluoksniuose pakitimų nematyti.



16 pav. (A) Plyšio pavidalo incizija (250 μm) femtosekundiniais UV impulsais. (B) padidintas pažymėto ploto vaizdas. Pjūvyje matomos epitelio liekanos. Šviesos mikroskopija

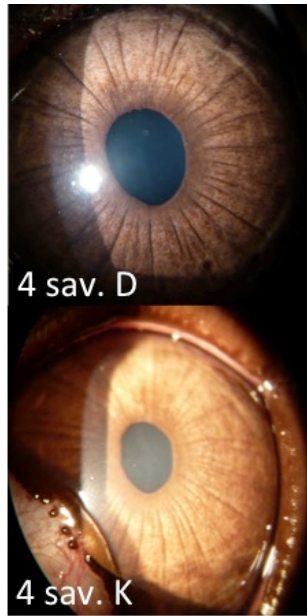
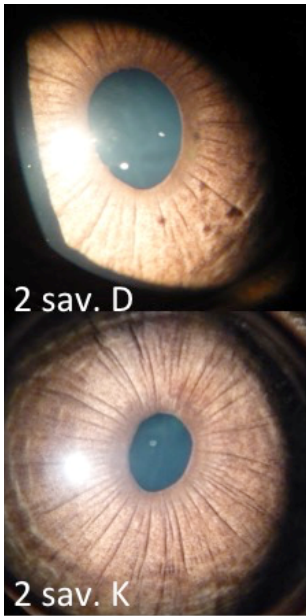
4.2.6. Ragenų subepitelinės miglos įvertinimas, histologiniai tyrimai ir transmisinė elektroninė mikroskopija

Ragenos epitelizavosi per 4–7 dienas. Subepitelinė migla pradėjo formuotis po epitelizacijos (pirmosios savaitės pabaigoje – antrą savaitę po operacijų), buvo ryškiausia po 1–2 mėnesių ir paskui pamažu silpnėjo per visą 6 mėnesių stebėjimo laikotarpį (12, 17, 24 pav.). 17 pav. matome, kaip keitėsi subepitelinė migla po gilios abliacijos femtosekundiniais UV impulsais nuo pirmos dienos po operacijos iki penkių mėnesių.

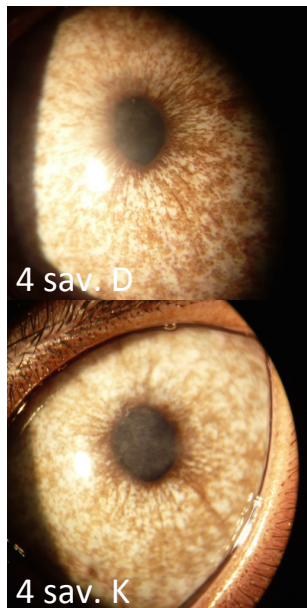


17 pav. Rageną po gilios abliacijos (130 μm) femtosekundiniais UV impulsais. (A) Epitelio defektas pirmą pooperacinę dieną (pažymėtas rodyklėmis). (B) Trečio laipsnio subepitelinė migla po mėnesio. (C) Antro laipsnio subepitelinė migla po 3 mėnesių. (D) Antro laipsnio subepitelinė migla po 5 mėnesių

Nustatėme aiškius individualių gyvūnų gijimo skirtumus. Vienodomis sąlygomis operuotų triušių ragenos gijo skirtingai, o to paties triušio akys po skirtingų procedūrų gijo panašiai. Pavyzdžiui, 18 ir 19 pav. parodyta subepitelinė migla po 30 μm abliacijos skirtingais lazeriais kontralateralinėse dviejų triušių akyse praėjus 2 ir 4 savaitėms. Matome, kad vieno triušio (18 pav.) abi ragenos vienodai skaidrios, o antrojo (19 pav.) – vienodai drumstos.



18 pav. Panašus subepitelinės miglos laipsnis abiejose to paties triušio akyse. Akys praėjus 2 ir 4 savaitėms po 30 μ m gylio abliacijos. Subepitelinė migla visose akyse yra 0,5 laipsnio. Dešinioji (D) akis operuota nanosekundiniais eksimeriniais UV, kairioji (K) – femtosekundiniais UV impulsais

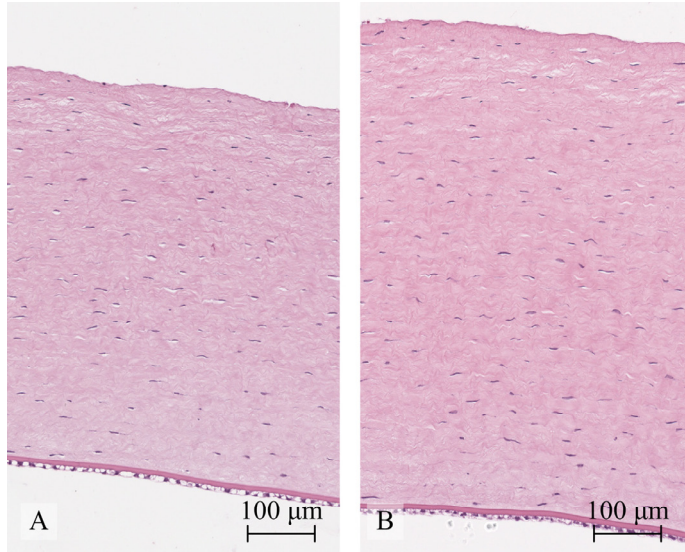


19 pav. Panašus subepitelinės miglos laipsnis abiejose to paties triušio akyse. Akys praėjus 2 ir 4 savaitėms po 30 μ m gylio abliacijos. Subepitelinė migla visose akyse yra trečio laipsnio. Dešinioji (D) akis operuota femtosekundiniais UV, kairioji (K) – nanosekundiniais eksimeriniais UV impulsais

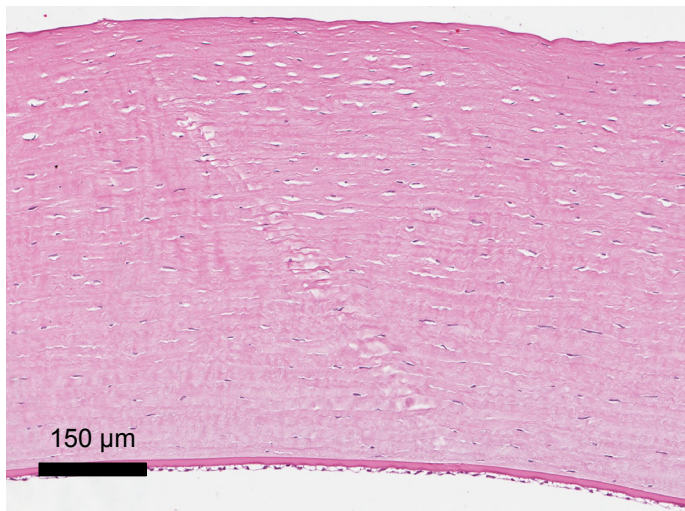
Gili ir negili abliacija femtosekundiniais UV impulsais. Septyniems triušiams vienoje akyje buvo atlikta gili (130 μ m, apie 13,0 D), o kitoje negili (30 μ m, apie 2,5 D) abliacija. Apžiūrint mikroskopu iškart po operacijos, abliuotos stromos paviršius atrodė panašaus lygumo. Dviem triušiams eutanazija buvo atlikta iškart po operacijų ir

atlikti histologiniai tyrimai. 20 pav. parodyta, kad šviesos mikroskopijos preparatuose nematyti paviršiaus lygumo skirtumo. Gilesnė stroma ir endotelis išlikę nepažeisti.

Palyginimui, kontrolinės akies, kurioje buvo tik mechaniškai pašalintas epitelis, paviršiaus lygumas parodytas 21 pav.

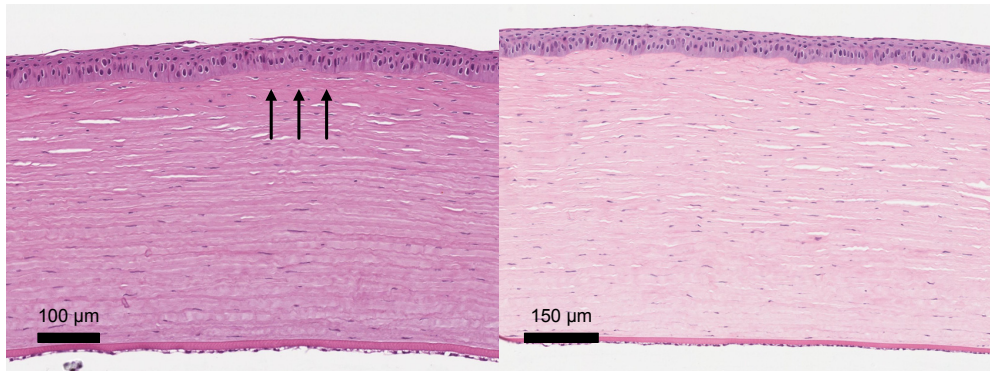


20 pav. Ragenos stromos paviršius iškart po (A) gilios (130 μm) ir (B) negilios (30 μm) abliacijų femtosekundiniais UV impulsais. Šviesos mikroskopija



21 pav. Kontrolinė ragena, kur buvo tik mechaniškai pašalintas epitelis. Šviesos mikroskopija

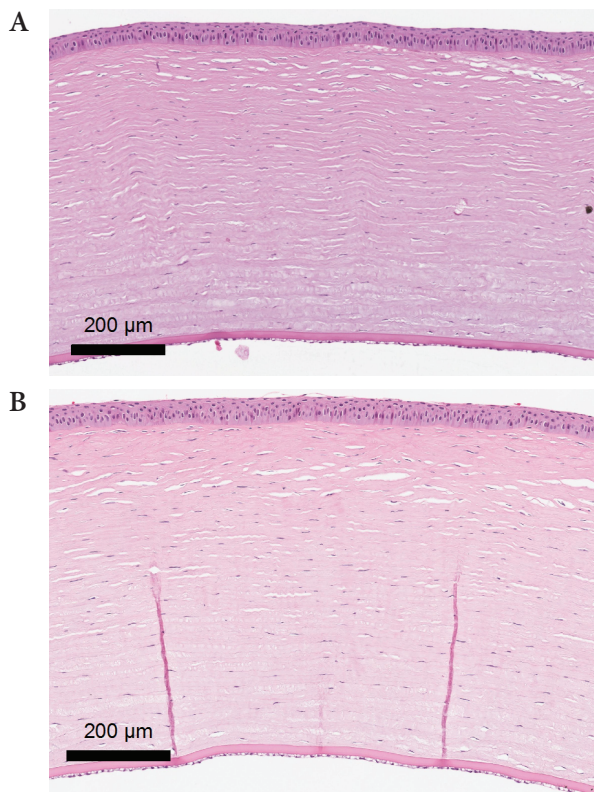
Penkiems triušiams intervalas tarp skirtingų akių operacijų buvo 3–4 savaitės. Jie buvo stebimi 6 mėnesius nuo antrosios akies operacijos. 22 pav. pavaizduotos to paties triušio akys po skirtingo gylio abliacijos. Akyje, kurioje atlikta gili abliacija, po 7 mėnesių subepitelinė migla buvo 2 laipsnio, o akyje, kurioje atlikta negili abliacija po 6 mėnesių liko tik 0,5 laipsnio migla. Atitinkamai histologiniuose preparatuose skiriasi subepitelinės fibrozės sluoksnių storis. Gilesnėje stromoje, Descemeto membranoje ir endotelioje pataloginių pakitimų nebuvo matyti.



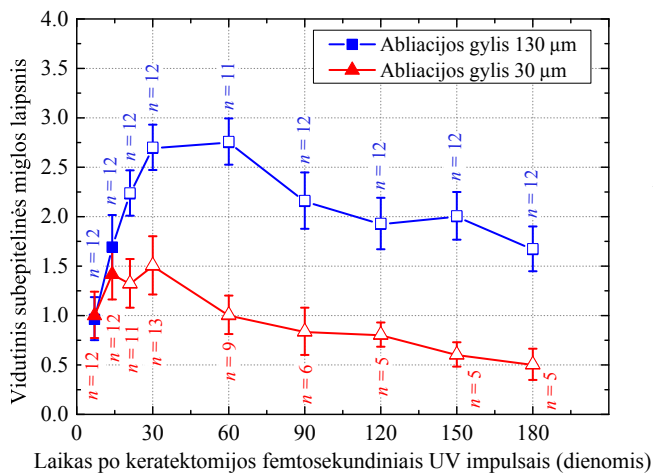
22 pav. Ragenos po abliacijos femtosekundiniais UV impulsais (šviesos mikroskopija). Kairėje – ragena po gilios abliacijos (130 μm), subepitelinės fibrozės sluoksnis pažymėtas rodyklėmis. Dešinėje – ragena po 30 μm gylio abliacijos, fibrozė minimali. Matyti, kaip epitelis užpildo stromos nelygumus ir susidaro lygus paviršius

23 pav. parodyti vieno geresnių atvejų po abliacijos femtosekundiniais UV impulsais šviesos mikroskopijos vaizdai. Iš pradžių dešiniojoje akyje buvo atlikta gili abliacija (130 μm), o po mėnesio kairiojoje akyje atlikta negili (30 μm) abliacija. Akyje po gilios abliacijos po mėnesio buvo matoma trečio laipsnio subepitelinė migla, po 7 mėnesių ji praskaidrėjo iki pirmo laipsnio. Kitoje to paties triušio akyje, kur buvo atlikta negili abliacija, subepitelinė migla, pasiekusi antrą laipsnį po mėnesio, praėjus šešiams mėnesiams buvo tik 0,5 laipsnio.

Kaip tikėtasi, gilesnė abliacija lėmė intensyvesnę subepitelinę miglą 24 pav. Siekiant didesnio rezultatų patikimumo, ištrauktos visos akys, operuotos vienodomis sąlygomis. Gili abliacija iš viso buvo atlikta 13 akių (8 akyse iš mažų ir didelių dėmių grupės ir 5 iš gilios ir negilios abliacijos grupės), tačiau viena akis, kurios reepitelizacija užtruko daugiau nei 7 dienas, buvo atmesta. Negili abliacija buvo atlikta 13 akių (5 akyse iš gilios ir negilios abliacijos, ir 8 akyse iš abliacijos femtosekundiniais ir eksimeriniais impulsais grupių).



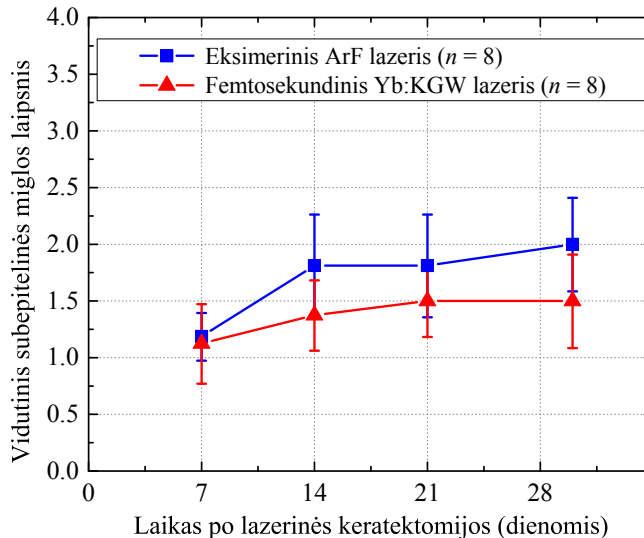
23 pav. Triušio, operuoto femtosekundiniais UV impulsais, ragenos. (A) Minimalūs subepiteliniai mikrožidininiai fibroziniai pakitimai dešiniojoje akyje ir netolygus epitelio storis po gilios (130 µm) abliacijos praėjus 7 mėnesiams, (B) kairioji ragena be matomų pakitimų po negilios (30 µm) abliacijos praėjus 6 mėnesiams. Šviesos mikroskopija



24 pav. Subepitelinės miglos kitimas po gilios (130 µm) ir negilios (30 µm) abliacijų femtosekundiniais UV impulsais. Tuščiaviduriai simboliai rodo, kad subepitelinės miglos laipsnio skirtumas buvo statistiškai reikšmingas (n=akių skaičius)

Abliacijos femtosekundiniais UV ir nanosekundiniais UV eksimerinio lazerio impulsais palyginimas. Devyniems triušiams vienoje akyje buvo atlikta abliacija femtosekundiniais UV impulsais (30 μm), o kitoje – eksimeriniu lazeriu (30 μm). Keturi triušiai operuoti tą pačią dieną, trys – su 4 savaitių, vienas – su 2 savaitių, ir vienas – su savaitės pertrauka. Aštuoniems gyvūnams eutanazija buvo atlikta po mėnesio, o vienas buvo stebėtas 6 mėnesius. Buvo pasirinktas mėnesio terminas, nes tyrimai rodo, kad tuo metu triušiams matoma ryškiausia subepitelinė migla po abliacijos eksimeriniu lazeriu (Mohan, Hutcheon et al. 2003). Be to, ir mūsų atlikti eksperimentai tiriant subepitelinės miglos vystymąsi po gilios ir negilios abliacijos parodė, kad intensyviausia subepitelinė migla buvo po 1–2 mėnesių (24 pav.).

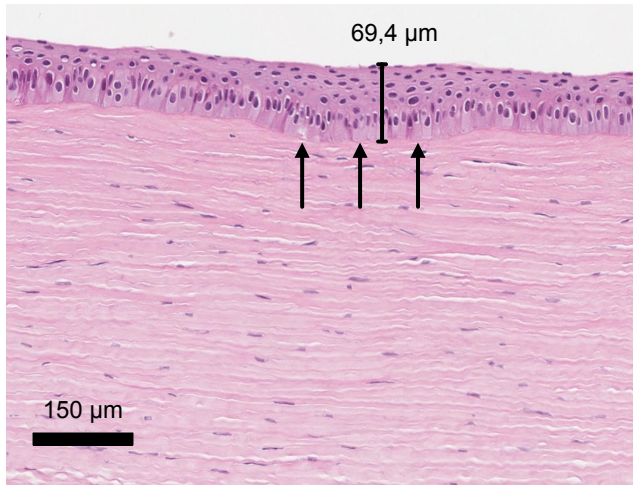
Dviejose akyse (vienoje po abliacijos femtosekundiniais UV impulsais ir vienoje po abliacijos eksimeriniais) išsivystė pooperacinis keratitas, todėl šios akys toliau nebuvo stebimos. Gijimas buvo panašus abiejose akyse, operuotose skirtingais lazeriais. Nors šiose akyse buvo atlikta negili abliacija, tačiau visose išsivystė subepitelinė migla (25 pav.). Ji buvo kiek mažiau intensyvi femtosekundiniais UV impulsais abliuotose ragenose (vidutinė subepitelinė migla atitinkamai $1,5 \pm 1,1$ ir $2,0 \pm 1,1$), bet skirtumas buvo statistiškai nepatikimas ($p=0,05$).



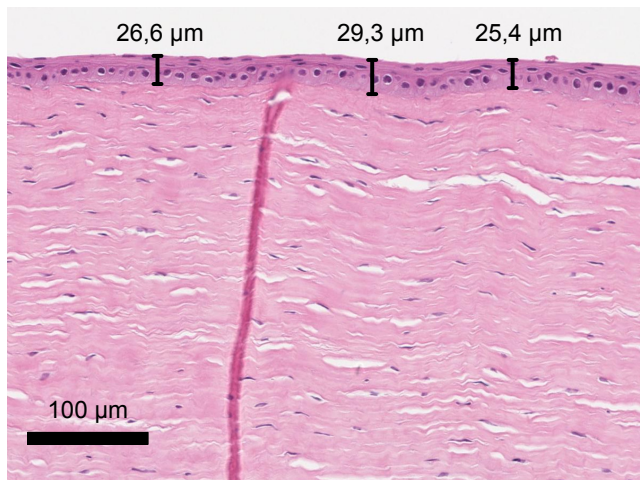
25 pav. Subepitelinės miglos kitimas po vienodo gylio (30 μm) abliacijos femtosekundiniais UV ir eksimeriniais impulsais (n=akių skaičius)

Šviesos mikroskopija po mėnesio neparodė esminių skirtumų ragenose, operuotose eksimeriniu ir femtosekundiniu lazeriais. Epitelis femtosekundiniais UV impulsais abliuotose ragenose buvo normalus, išskyrus vienoje ragenoje rastą epitelio hiperplaziją (26 pav.).

Trijose iš septynių eksimeriniu lazeriu operuotų ragenų matėsi lokalūs išplonėjimai (atrofija) (27 pav.), vienoje – nedidelė epitelio pamatinių ląstelių edema.

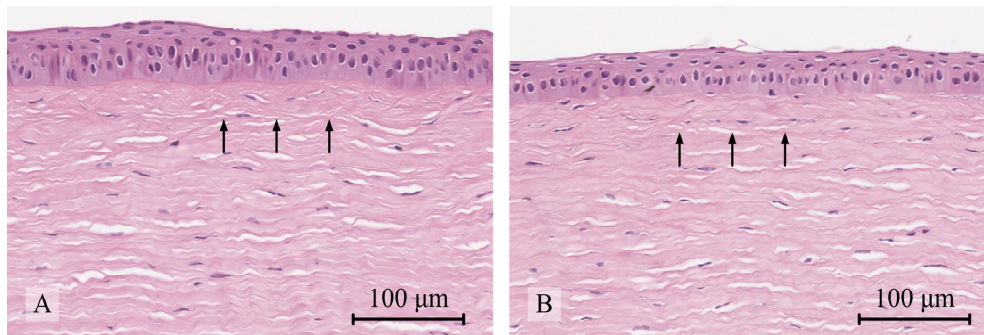


26 pav. Epitelio hiperplazija femtosekundiniais UV impulsais operuotoje akyje (30 μm gylio abliacija). Šviesos mikroskopija



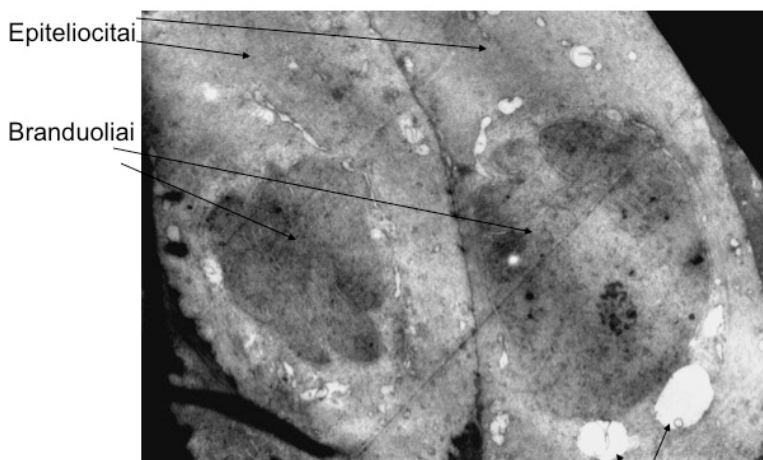
27 pav. Plonas epitelio sluoksnis nanosekundiniais UV eksimerinio lazerio impulsais operuotoje akyje. Šviesos mikroskopija

Ragenose su ryškesne subepiteline migla susidarė subepitelinės fibrozės sluoksniai, kurių storis ir struktūra buvo panašūs akyse, operuotose skirtingais lazeriais (28 pav.).

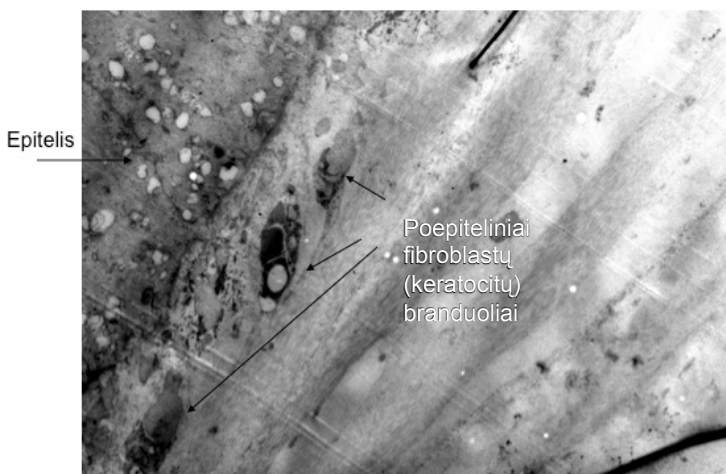


28 pav. Mėnuo po abliacijos, to paties triušio akys. Subepitelinės fibrozės sluoksnis (rodyklės) buvo panašaus gylio po abliacijos femtosekundiniais UV (A) ir eksimeriniais (B) impulsais. Šviesos mikroskopija

Transmisinė elektroninė mikroskopija (TEM). TEM atlikta praėjus mėnesiui po 30 μm abliacijos abiejose vieno triušio akyse. Dešinioji akis buvo operuota eksimeriniu, o kairioji – femtosekundiniu lazeriu. Abiejose akyse buvo švelni 0,5 laipsnio subepitelinė migla. TEM neparodė skirtumų tarp skirtingais lazeriais abliuotų akių. Preparatuose matomos intraepitelinės vakuolės, aktyvuoti keratocitai (fibroblastai) po epitelium (29, 30 pav.).



29 pav. Nanosekundiniais UV eksimerinio lazerio impulsais operuotos akies pamatiniai epitelioцитai su intracitoplazminėmis vakuolėmis (TEM, padidinimas 14 000 kartų)



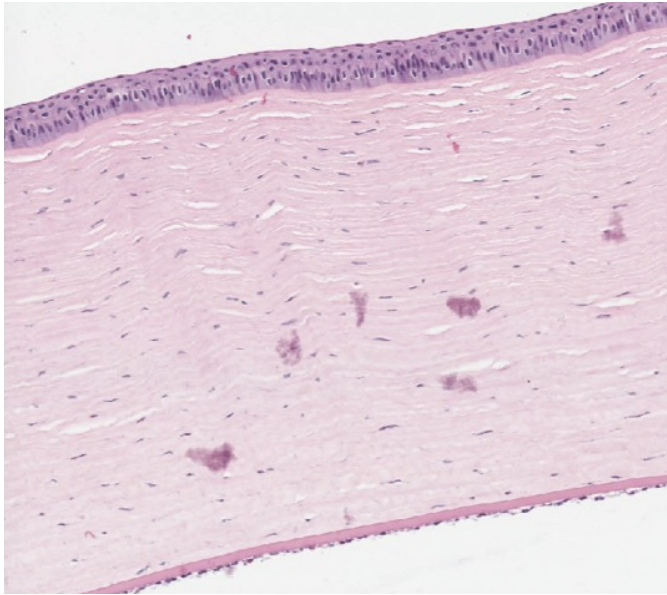
30 pav. Femtosekundiniais UV impulsais operuotos ragenos poepitelinis sluoksnis, kuriame matomi aktyvuoti keratocitai (fibroblastai). (TEM, padidinimas 4000 kartų)

4.2.7. Eksperimentai kai kurių veiksnių įtakai gijimui iširti

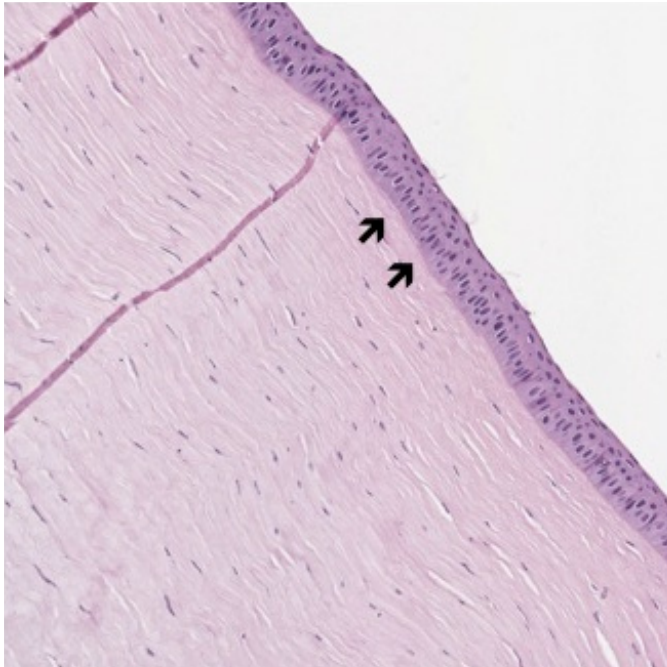
Atlikome tris eksperimentus, kurie padėjo suprasti kai kuriuos gijimo eigos ypatumus. Vertinome abliuoto paviršiaus lygumo, stromos brinkinimo abliacijos metu ir MMC įtaką gijimo rezultatams.

4.2.7.1. Abliuoto paviršiaus lygumo įtaka gijimui

Vienam triušiu femtosekundiniais UV impulsais kairiojoje akyje atlikome standartinę 30 μm abliaciją, o dešiniojoje suformavome nelygų paviršių: atlikę 20 μm abliaciją, toliau formavome 20 μm gylio „duobes“. Po paros dešinėsios ragenos paviršius atrodė nelygus, tačiau gijimas vyko abiejose akyse panašiai, ir po 6 mėnesių abi ragenos buvo beveik skaidrios (0,5 laipsnio subepitelinė migla). Histologiniai preparatai dešiniojoje akyje parodė minimaliai nelygų epitelį, užpildantį labai menkus stromos nelygumus, o kairiojoje akyje – minimalius fibrozinis subepitelinius pakitimus (31, 32 pav.). Šių dviejų akių gijimo baigtys buvo panašios. Tyrimus galima būtų tęsti, operuojant daugiau triušių.



31 pav. Ragna praėjus 6 mėnesiams po abliacijos su 20 µm gylio „duobėmis“. Matomi nedideli epitelio storio nelygumai. Stromoje pakitimų nematyti. Šviesos mikroskopija



32 pav. Ragna praėjus 6 mėnesiams po standartinės 30 µm gylio abliacijos. Matomi nedideli subepiteliniai fibroziniai pakitimai (rodyklės). Šviesos mikroskopija

4.2.7.2. Stomos brinkinimo įtaka abliacijos eigai ir gijimui

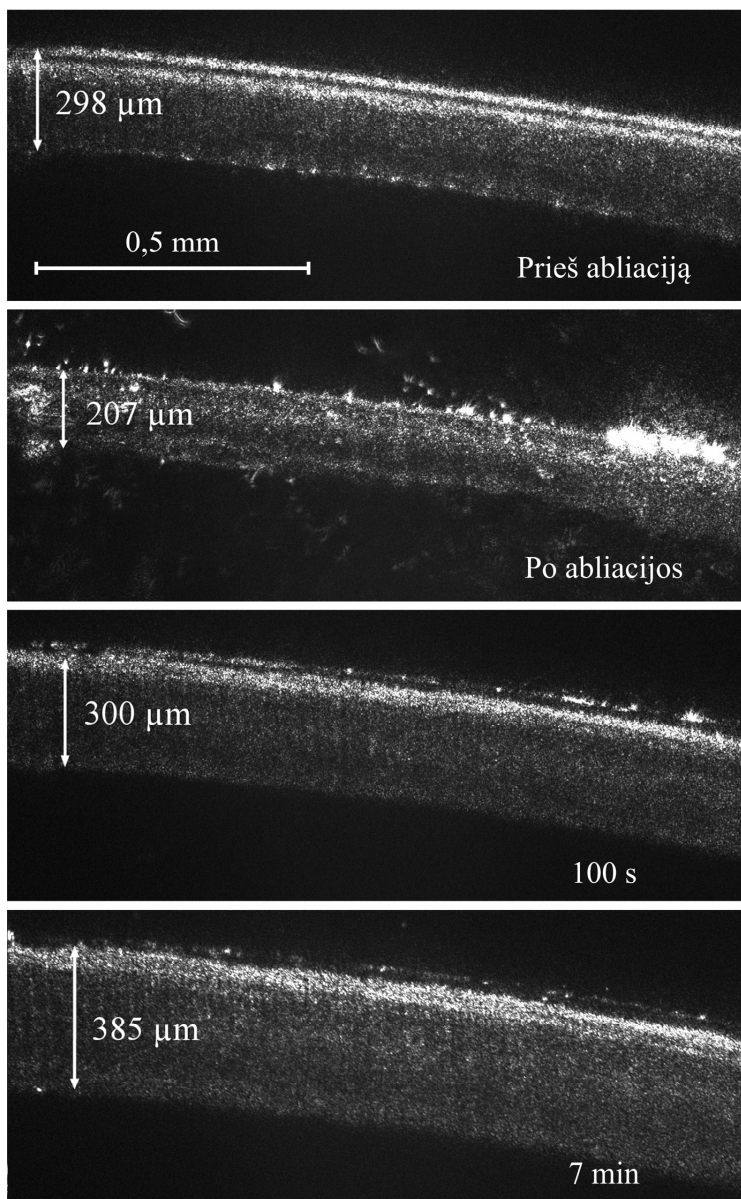
Atlikome eksperimentą su trimis triušiais stebėdami brinkimo (hidracijos) įtaką abliacijos femtosekundiniais UV impulsais eigai ir gijimui. Norėjome patikrinti: 1) kaip išbrinkinus rageną kinta abliacijos našumas, 2) ar nuo brinkimo priklauso stromos paviršiaus lygumas, 3) kaip brinkimas veikia gijimo eigą.

Dviems triušiams visose akyse atlikome gilią abliaciją (130 μm). Ragenas brinkinome dviem būdais: dešiniuosiose akyse ragenas brinkinome po abliacijos: mechaniškai pašalinę epitelį 7,5 mm skersmens plote, 5 mm skersmens plote atlikome abliaciją, po to lašino SBT ir laukėme 6 minutes stebėdami, kad paviršius neišdžiūtų. Kairiosiose akyse ragenas brinkinome abliacijos metu: po epitelio pašalinimo atlikome apie 5 μm abliaciją, tada lašino SBT ir laukėme 7 minutes, ir paskui atlikome likusią abliaciją. Pachimetru matavome ragenų storį, procesą filmavome.

Nustatėme, kad stroma smarkiai brinksta drėkinant abiem būdais. Paburkusioje stromoje mažėja abliacijos našumas: nebrinkintose ragenose vienu sluoksniu skirtinigiems triušiams buvo pašalinama 1,8 μm ir 1,5 μm audinio, o brinkintose atitinkamai 1,0 μm ir 1,3 μm .

Šiame eksperimente iškart po abliacijos ragenų lygumas išoriškai atrodė blogesnis nei abliuojant įprastu būdu (subjektyvus pastebėjimas). Triušius stebėjome 6 mėnesius. Tik vienoje akyje, kuri buvo brinkinta po abliacijos gijimas atitiko įprastą eigą. Histologinis šios ragenos tyrimas parodė mikrožidininis poepitelinius fibrozinius pakitimus su netolygia epitelio edema. Tai pakitimai, kurie randami po įprastos abliacijos. To paties triušio kairiosios akies reepitelizacija užtruko daugiau nei 10 dienų, ragena sugijo su intensyvia drumstimi — po mėnesio subepitelinė migla buvo 4 laipsnio, o po 6 mėnesių praskaidrėjo iki 2 laipsnio. Kito triušio abi akys epitelizavosi normaliai, bet ragenose susiformavo duobutės. Šio triušio histologiniuose preparatuose rasta epitelio židininė atrofija su pamatinių sluoksnių ir poepiteline edema, o kairiojoje ragenoje – ir plazmocitų infiltracija.

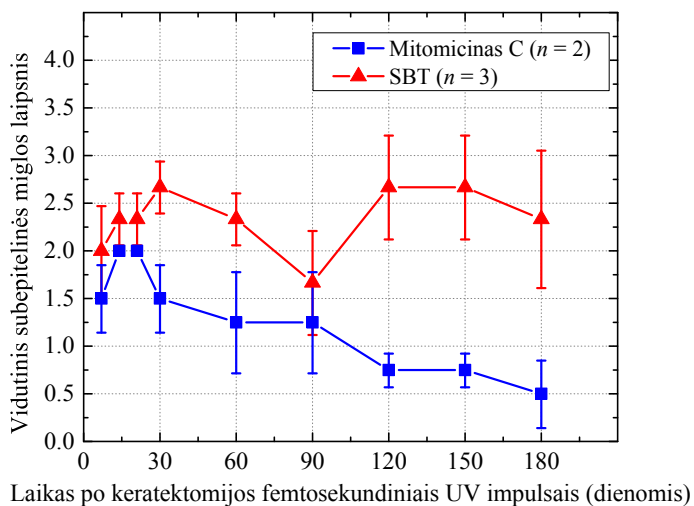
Siekdami paaukoti mažiau gyvūnų, brinkinimo eksperimentus atlikome su vienu prieš 4 mėnesius femtosekundiniu lazeriu operuotu triūšiu. Šiam gyvūnui dešiniojoje akyje lazeriu buvo pašalintas epitelis (20 skenavimo sluoksnių), tada atlikta abliacija iki perforacijos (135 skenavimo sluoksniai), o kairiojoje lazeriu pašalintas epitelis ir priekiniai stromos sluoksniai (40 skenavimo sluoksnių), tada ragena brinkinta 12 min. lašinant SBT, po ko atlikta abliacija iki perforacijos (120 sluoksnių). Šio triušio kairiosios akies stromos brinkimo eiga parodyta 33 pav., kur matyti, kad per 7 minutes ragena sustorėjo beveik dvigubai.



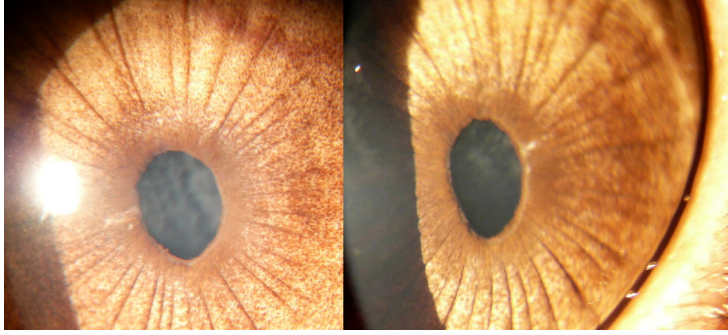
33 pav. Ragenos stromos brinkimas akyje, kurioje pašalinus epitelį ir priekinius stromos sluoksnius, 12 minučių buvo lašintas SBT. Virš stromos matosi skysčio sluoksnis. Kadrai iš vaizdo įrašo

4.2.7.3. Abliacija su MMC

Trims triušiams gili abliacija (130 μm) femtosekundiniais UV impulsais buvo atlikta vienoje akyje naudojant 0,02% MMC (Mitomycin 2 medac, Medac, Hamburg; ištirpintas SBT) tirpalą, o kitoje, kontrolinėje – SBT. Atitinkamu tirpalu sumirkyta trikampiuko pavidalo kempinėle buvo laikoma 2 minutes ant stromos paviršiaus iškart po abliacijos. Paskui akys buvo gausiai išplaunamos SBT tirpalu (30 ml). Visi triušiai buvo operuoti tą pačią dieną ir stebėti 5,5 mėnesio. Vienoje akyje, operuotoje su MMC, reepitelizacija užtruko 8 dienas, todėl šios akies subepitelinės miglos duomenys grafike (34 pav.) nenurodyti. Individualios akys gijo skirtingai, tačiau akyse su MMC subepitelinė migla buvo mažiau intensyvi (34 pav.). Skyrėsi ir drumsties morfologija: nenaudojant MMC drumstis buvo labiau tolygi, dėmelių pavidalo, o su MMC ji buvo taškelių su skaidriais tarpais pavidalo (35 pav). Histologiniai tyrimai rodė minimalią mikrožidininę poepitelinės stromos fibrozę. Vienoje ragenoje, operuotoje su SBT, patologiinių histologinių pakitimų nepastebėta. Akivaizdu, kad kontrolinių ragenų gijimą galėjo įtakoti ir stromos išbrinkimas nuo SBT.



34 pav. Subepitelinės miglos laipsnio kitimas po abliacijos femtosekundiniais UV impulsais su mitomicinu C ir subbalansuotu druskų tirpalu (SBT) ($n =$ akių skaičius)



35 pav. Subepitelinė migla praėjus 2 mėnesiams po abliacijos femtosekundiniais UV impulsais: kairėje – dešinioji, kontrolinė, akis, dešinėje – kairioji akis, operuota su MMC

4.3. Trečiosios eksperimentų serijos rezultatai

Ankstesniuose eksperimentuose buvo nustatyta, kad abliacija femtosekundiniais UV impulsais yra efektyvi. Gijimo eiga ir baigtys buvo panašios į eigą ir baigtis po abliacijos nanosekundiniais eksimeriniais UV impulsais. Nors abliacijos greitis buvo panašus į mūsų naudotos eksimerinės sistemos greitį (30 μm gylio abliacija 5 mm optinėje zonoje femtosekundiniu lazeriu užtruko 11 s, o eksimeriniu – 10 s), tačiau optimizuojant lazerį buvo galima greitį padidinti. Eksperimentų tikslas buvo įvertinti gijimą po greitesnės abliacijos. Transepitelinis abliacijos būdas buvo pasirinktas dėl šių priežasčių:

- kai nereikia mechaniškai šalinti epitelio, mažiau nei naudojant mechaninį mikrokeratomą skiriasi atskirų ragenu būseną iki abliacijos, nes nėra mechaninio streso, panaši dehidracija, visada vienoda abliacijos zona ir lygūs abliacijos zonos kraštai;
- sumažėja infekcijos rizika;
- atliekant TransFRK, reikia pašalinti daugiau ragenos audinių, todėl ilgiau užtrunka UV apšvita ir tai leidžia pastebėti potencialias problemas, pavyzdžiui, paviršiaus nelygumus ar kenksmingą terminį poveikį.

4.3.1. Abliacijos gylis ir ragenos centrinės dalies storio kitimas

RCS pachimetriniai matavimai ir apskaičiuoti jo pakitimai pateikiami 6 lentelėje.

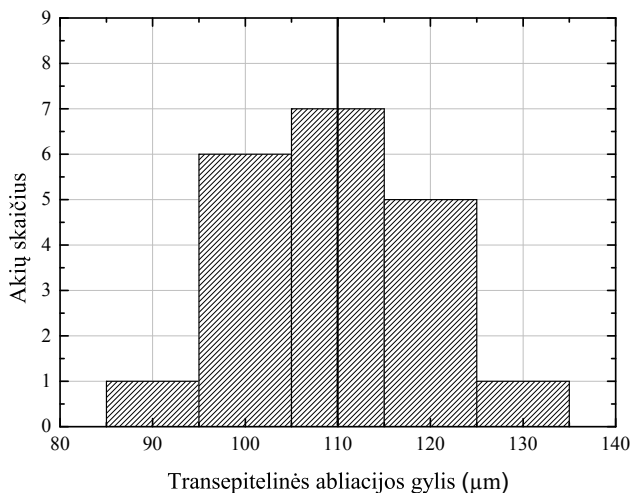
6 lentelė. Ragenos centrinės dalies storio (RCS) kitimas abliacijos metu. SN – standartinė nuokrypa.

	Nepertraukiama TransFRK femtosekundiniais UV impulsais, 110 μm	TransFRK nanosekundiniais eksimeriniais UV impulsais, 150 μm	Modifikuota TransFRK femtosekundiniais UV impulsais, 150 μm
Vidutinis ragenos centrinės dalies storis, μm ± SN			
Prieš abliaciją (D1)	347,0±30,5	370,7±26,0	359,2±20,1
Pašalinus epitelį (D2)	–	282,6±18,6	293,4±12,9
Po miopinės stromos abliacijos (D3)	237,7±26,4	219,3±17,9	210,8±9,4
Praėjus savaitei (D4)	269,6±23,5	249,9±18,8	239,6±13,4
Pašalintų epitelio ir stromos audinių storis, μm ± SN			
Epitelio pašalinimo stadija (iki fluorescencijos pasikeitimo) (D1-D2)	–	93,4±12,0	65,8±11,6
Stromos pašalinimo stadija (D2-D3)	–	62,4±9,8	82,6±8,0
Bendras pašalintų ragenos audinių storis, μm ± SN			
Iškart po abliacijos (D1-D3)	109,3±10,5	151,4±19,7	148,4±15,9
Praėjus savaitei (D1-D4)	75,8±23,3	120,8±17,4	119,6±28,3
Apskaičiuotas ataugusio epitelio storis, μm ± SN			
Epitelis praėjus savaitei (D4-D3)	34,9±20,5	30,6±19,5	28,8±13,9

Mėlynos fluorescencijos dinamika abliacijos metu rodė, kad epitelio storis abliacijos zonoje nebuvo vienodas (6 pav). Išanalizavę 11 nepertraukiamos TransFRK abliacijos vaizdo įrašų, nustatėme, kad 6 mm abliacijos zonoje atskiro triušio epitelio storio skirtumas buvo ~12% (4–6 μm) nuo maksimalaus storio dydžio. Šioje 6 mm zonoje epitelio abliacijos trukmė centre ir periferijoje nesiskyrė, o storesni epitelio segmentai buvo pasiskirstę atsitiktinai. Procedūra nebuvo stabdoma, todėl pachimetrija po epitelio abliacijos nebuvo įmanoma.

Svarbu atkreipti dėmesį į tai, kad po stromos abliacijos femtosekundiniais UV impulsais, nepriklausomai nuo modifikacijos, pachimetrija buvo atliekama be drėkinimo, o po abliacijos nanosekundiniais eksimeriniais UV impulsais stromos paviršius buvo per sausas pachimetrijai, todėl RCS teko matuoti sudrėkinus daviklio viršūnę SBT.

Iš pachimetrijos matavimų, atliktų po stromos abliacijos, matyti, kad nepertraukiamos TransFRK femtosekundiniais impulsais abliacijos gylis 90% atvejų buvo $110 \pm 15 \mu\text{m}$, t. y. atitiko planuotą, ir buvo atkartojamas (36 pav). Penkiose rageno-se po modifikuotos TransFRK femtosekundiniais impulsais abliacijos gylis buvo $148.4 \pm 15.9 \mu\text{m}$, t. y. taip pat atitiko planuotą ($150 \mu\text{m}$).



36 pav. Nepertraukiamos TransFRK abliacijos femtosekundiniais UV impulsais gylis. Apskaičiuota, matuojant RCS prieš ir iškart po abliacijos

Šalinant epitelį FTK būdu eksimeriniu lazeriu, pamatuotas pachimetru FTK gylis netikėtai buvo $93,4 \pm 12 \mu\text{m}$ vietoje $55 \mu\text{m}$, nors procesas buvo stebimas mikroskopu ir sustabdytas, kai pasirodė stromos paviršius. Apšviestoje operacinėje buvo sunku įžiūrėti mėlynos fluorescencijos pasikeitimą, bet vaizdo įrašuose šis momentas buvo matomas labai aiškiai. Toliau abliuojant stromą, realus abliacijos gylis atitiko nustatytą ($70 \mu\text{m}$).

Visas abliacijos eksimeriniu lazeriu gylis buvo $151,4 \pm 19,7 \mu\text{m}$, ir tai buvo gerokai daugiau nei abliuojant femtosekundiniais impulsais ($110 \mu\text{m}$). Šį ženklų abliacijos gylio pachimetrinių matavimų neatitikimą galėjo lemti keli veiksniai. Po epitelio pašali-

nimo atliekant pachimetriją dėl paviršiaus sausumo reikėjo giliau įspausti rageną tam, kad atsirastų kontaktas su davikliu. Tikras stromos storis galėjo neatitikti pamatuoto dėl ragenos dehidracijos ir susitraukimo, nes procedūra su pauzėmis ilgai užtruko. Be to, eksimero bangos ilgio spinduliuotę gerai sugeria skysčiai (Keates, Bloom et al. 1990; Dair, Ashman et al. 2001), todėl galėjo padidėti išdžiūvusios ragenos abliacijos našumas. Matavimai galėjo skirtis dar ir todėl, kad eksimerinio lazerio dėmės dydis buvo 2 mm, o tai sudaro trečdalį viso abliacijos zonos skersmens (6 mm), todėl sunku tikėtis tolygios abliacijos visame plote. Reikia pažymėti, kad yra aprašytas žmonių ragenų pachimetrinių matavimų TransFRK procedūros metu ir realaus abliacijos gylio neatitikimas (28 proc., 36,36 μm), kuris priklausė nuo procedūros trukmės (Adib-Moghaddam, Arba-Mosquera et al. 2014).

Manome, kad tikrąją abliacijos gylį tiksliausiai parodo skirtumas tarp ragenos storio prieš abliaciją ir maždaug po savaitės, kai baigiasi reepitelizacija (6 lentelė). Šiuo atveju veiksniai, lemiantys matavimų paklaidas, turėtų būti panašūs visose trijose grupėse, ir ragenų hidracija turėtų labai nesiskirti. Šis skirtumas po femtosekundinės TransFRK ir modifikuotos TransFRK atitiko planuotąjį, o po abliacijos eksimeriniu lazeriu buvo $120.8 \pm 17,4 \mu\text{m}$ vietoje numatyto 70 μm . Tai buvo vienas iš pagrindinių motyvų, kodėl modifikuotai abliacijai femtosekundiniais UV impulsais pasirinkome pagilinti ne epitelio, o stromos abliacijos etapą.

4.3.2. Abliacijos greitis

Išnagrinėjus RCS kitimo duomenis po TransFRK femtosekundiniais UV impulsais buvo įvertintas ragenos audinių abliacijos našumas. Laikydami, kad epitelio ir stromos abliacijos greitis vienodas, nustatėme, kad abliuojant didelės galios femtosekundine sistema, vienu mJ galima pašalinti ~280 pL ragenos audinio, taigi, viena miopinė dioptrią 6 mm optinėje zonoje pašalinama per ~1,6 s.

Abliacijos greitį galima apskaičiuoti ir kitu būdu. Vertinant refrakcijos pokytį pagal RCS pakitimą po reepitelizacijos (Niemz 2007) nepertraukiamos TransFRK femtosekundiniais impulsais abliacijos greitis būtų ~1,45 s/D, o modifikuotos - ~1,62 s/D. Apskaičiuojant modifikuotos abliacijos greitį, įtrauktas tikrasis abliacijos laikas, atmetus pauzes.

Abliacijos ir pauzių trukmės parodytos 7 lentelėje.

7 lentelė. Epitelio ir stromos abliacijos trukmės.

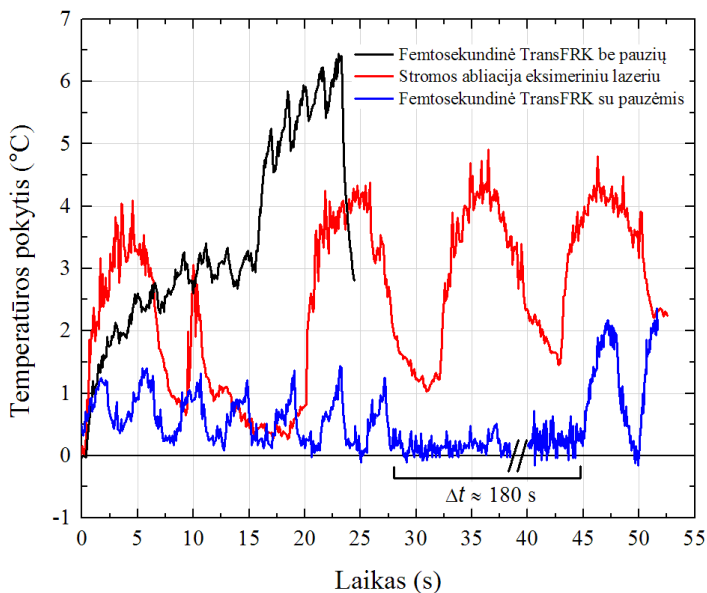
	Nepertraukiama TransFRK fem- tosekundiniais UV impulsais, 110 μm	TransFRK nanosekundiniais eksimeriniais UV impulsais, 150 μm	Modifikuota TransFRK fem- tosekundiniais UV impulsais, 150 μm
Epitelio abliacija (su pauzėmis)	15 s (15 s)	55 s (~69 s)	15 s (29 s)
Pertrauka tarp epitelio ir stromos abliacijos	–	~180 s	180 s
Stromos abliacija (su pauzėmis)	8 s (8 s)	30 s (~36 s)	14 s (20 s)
Visa procedūros trukmė	23 s	~285 s	229 s

4.3.3. Ragenos paviršiaus temperatūra

Paviršiaus temperatūros kitimas abliuojant skirtingais būdais parodytas 37 pav. Nepertraukiamos TransFRK abliacijos femtosekundiniais UV impulsais metu temperatūros pakilimas siekė $< 7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ir buvo didžiausias procedūros pabaigoje (juoda linija). Temperatūros kitimas priklausė nuo lazerio pluoštelio skenavimo algoritmo. Po epitelio abliacijos, kuri buvo atliekama 6,6 mm skersmens zonoje ir užtrukdavo ~15 s, vyko lęšio formavimas stromoje, sumažinus abliacijos zoną iki 6 mm. Epitelio abliacijos metu galia buvo pasiskirsčiusi maždaug tolygiai, nes buvo šalinamas gana vienodo storio audinių sluoksnis, o formuojant lęšį stromoje didžiausia galia buvo abliacijos zonos centre. Be to, stroma jau buvo įkaitusi šalinant epitelį, o pertraukos nebuvo daromos. Šios priežastys lėmė temperatūros pakilimą stromos abliacijos pradžioje. Siekiant išlaikyti tolygų terminį poveikį, stromos miopinė abliacija vyko kaitaliojant didesnio ir mažesnio skersmens sluoksnius. Juodos kreivės „dantys“ rodo, kaip kito temperatūra priklausomai nuo sluoksnio skersmens.

Raudona linija (37 pav.) rodo, kad abliuojant nanosekundiniais eksimeriniais UV impulsais, kai procesas vyko su pauzėmis, stromos temperatūra pakilo ne daugiau kaip $4.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (epitelio abliacija neparodyta).

Žemiausia temperatūra stebėta modifikuotos TransFRK metu. Dėl pauzių epitelio abliacijos metu temperatūra pakilo tik $1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, o per visą procedūrą pakilimas buvo tik $\sim 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (37 pav., mėlyna linija).



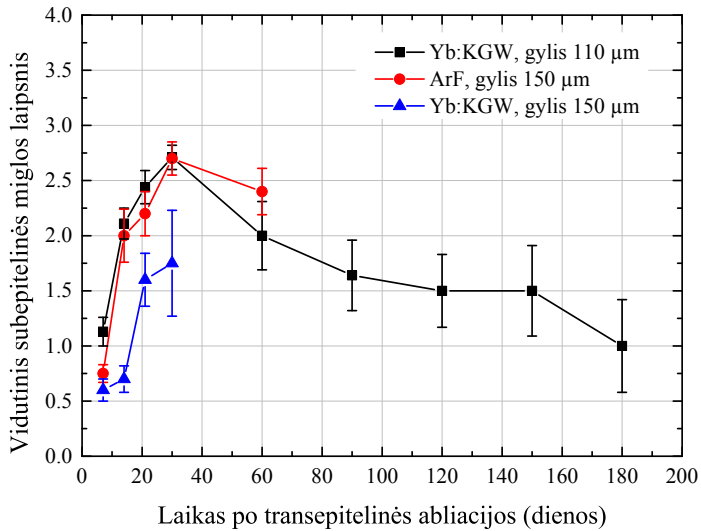
37 pav. Paviršiaus temperatūros dinamika stromos abliacijos metu. Vaizduojami matavimai karščiausiam taške, kuris buvo abliacijos centre

4.3.4. Subepitelinės miglos įvertinimas

Dviejose akyse po nepertraukiamos TransFRK abliacijos femtosekundiniais UV impulsais išsivystė pooperacinis keratitas, todėl jų subepitelinės miglos dinamika nevertinta. Vienu atveju po savaitės matytas epitelio defektas su infiltracija ir kraujosruva po trečiuoju voku. Antru atveju tris savaites gijimas vyko normaliai, tačiau ketvirtą savaitę abliacijos vietoje atsirado žiedo pavidalo infiltratas. Manome, kad keratitai galėjo išsivystyti dėl nepakankamo sterilumo laboratorijoje, kur buvo femtosekundinis lazeris, palyginti su sterilia eksimerinio lazerio operacinės aplinka. Be to, infekcijos šaltinis galėjo būti nevienkartiniai žiedai, naudoti akies obuolio vakuuminei imobilizacijai femtosekundinės procedūros metu.

Subepitelinė migla visais atvejais buvo pastebėta po savaitės, tapo intensyviausia po mėnesio, ir vėliau silpnėjo. 38 pav. parodytas subepitelinės miglos laipsnio kitimas skirtingais būdais abliuotose akyse. Silpniausia subepitelinė migla išsivystė po modifikuotos TransFRK femtosekundiniais impulsais. Ji buvo net silpnesnė nei po seklesnės nepertraukiamos TransFRK abliacijos femtosekundiniais impulsais. Lyginant subepitelinės miglos laipsnį to paties triušio kontralateralinėse akyse, jis praėjus savaitei ir praėjus mėnesiui buvo mažesnis po modifikuotos TransFRK femtosekundiniais

impulsais nei po transepitelinės abliacijos eksimeriniu lazeriu. Skirtumas statistiškai reikšmingas (atitinkamai $p = 0,0135$ ir $p = 0,0415$), tačiau reikia atsižvelgti į tai, kad šioje grupėje buvo tik 5 triušiai. Nerasta statistiškai patikimo subepitelinės miglos laipsnio skirtumo tarp akių po nepertraukiamos TransFRK femtosekundiniais UV impulsais ir transepitelinės abliacijos eksimeriniu lazeriu ($p > 0,05$).



Procedūra	Laikas po procedūros (dienomis)								
	7	14	21	30	60	90	120	150	180
Femtosekundinė TransFRK, 110 μm	19	18	18	17	7	7	7	6	5
Eksimerinė abliacija, 150 μm	10	9	10	10	5				
Femtosekundinė TransFRK, 150 μm	5	5	5	5					

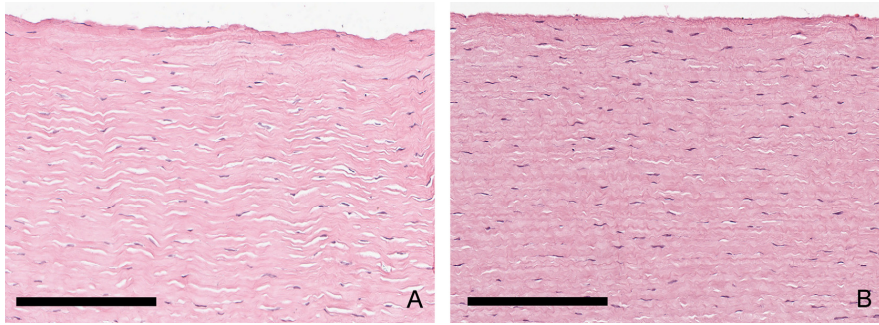
38 pav. Subepitelinės miglos kitimas po transepitelinės abliacijos skirtingais impulsais. Yb:KGW – femtosekundinis lazeris, ArF – eksimerinis lazeris. Lentelėje nurodytas akių skaičius

4.3.5. Histologiniai tyrimai

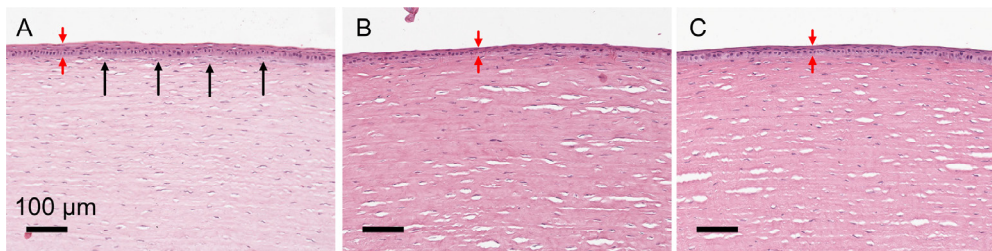
Šviesos mikroskopijos preparatuose nebuvo matyti esminių paviršiaus lygumo skirtumų tarp skirtingais būdais (eksimeru ir modifikuota TransFRK femtosekundiniais impulsais, 150 μm) operuotų ragenų (39 pav.).

Po mėnesio visose ragenose po nepertraukiamos TransFRK abliacijos femtosekundiniais UV impulsais epitelio storis buvo normalus su nedideliais nelygumais, kurie užpildė stromos nelygumus, t.y., epitelis išlygino ragenos paviršių. Trijose ragenose buvo matoma galima pavienių epitelio citų edema. Daugumoje ragenų po

abliacijos nanosekundiniais UV eksimeriniais impulsais ir modifikuotos TransFRK femtosekundiniais UV impulsais epitelis buvo nedaug suplonėjęs. Ragenų su subepiteline migla šviesos mikroskopijos preparatuose (40 pav.) buvo matomas subepitelinis fibrozės sluoksnis, kuris buvo panašus nepaisant skirtingų gydymo būdų. Gilesnėje stromoje ir vidiniuose ragenų sluoksniuose pakitimų nebuvo matyti.



39 pav. Stromos paviršius (A) po TransFRK femtosekundiniais UV impulsais; (B) po abliacijos nanosekundiniais UV eksimerinio lazerio impulsais. Paviršiaus lygumą reikėtų vertinti atsižvelgiant į tai, kad, sprendžiant pagal stromos banguotumą, nelygus pats (A) preparatas, todėl paviršius atrodo labiau banguotas. Šviesos mikroskopija, mastelio linija atitinka 100 μm



40 pav. Šviesos mikroskopijos preparatai praėjus mėnesiui po (A) nepertraukiamos TransFRK femtosekundiniais UV impulsais (110 μm), (B) nanosekundiniais UV eksimerinio lazerio impulsais (150 μm) ir (C) modifikuotos abliacijos femtosekundiniais UV impulsais. Epitelis plonesnis (B) ir (C) preparatuose (raudonos rodyklės). Juodos rodyklės rodo subepitelinį fibrozės sluoksnį. Šviesos mikroskopija

5. REZULTATŲ APTARIMAS

Ragenos refrakcinė chirurgija reikalauja ypatingo tikslumo, atkartojamumo ir saugumo, nes dažniausiai operuojama sveika ragena. Tai skatina vis patikimesnių metodų paieškas. XXI a. pirmasis dešimtmetis oftalmologijoje laikomas femtosekundinio lazerio eros pradžia. Pradedant nuo lopelio atpjovimo LASIK operacijos metu, kur šis lazeris jau įsitvirtino vietoje mechaninio mikrokeratomo, jo pritaikymo sriitys nepaliaujamai plečiasi. Jau įmanoma atlikti trumparegystės korekciją, naudojant tik femtosekundinį lazerį (Sekundo, Kunert et al. 2008; Shah ir Shah 2011), tačiau technologiškai ištobulinti eksimeriniai lazeriai ir toliau naudojami abliacijai. Nors tyrimai rodo, kad po operacijų nanosekundiniais kietakūniais ir eksimeriniais lazeriais gaunamos panašios klinikinės baigtys (Roszkowska, De Grazia et al. 2006), tačiau, nepaisant kietojo kūno lazerių privalumų, pastarieji sunkiai įsitvirtina rinkoje. Situacija rinkoje pasikeistų, jei vienu kietojo kūno lazeriu būtų galima atlikti visą LASIK operaciją bei kitas procedūras, kurioms šiuo metu reikia nanosekundinio ir (arba) femtosekundinio lazerio (Kittelman, Korn et al 2010; Kittelman, Korn et al 2012).

Ragenos abliacijai femtosekundiniai UV impulsai iki šiol nebuvo naudoti, nes tam reikia galingo lazerio su harmonikų generatoriumi. Toks lazeris yra Lietuvoje pagaminta lazerinė sistema „Pharos“. Mes pasiūlėme naują šio lazerio pritaikymą ragenos refrakcinėje chirurgijoje. Abliacija femtosekundiniais UV impulsais vyksta panašiai kaip dirbant su eksimeriniu lazeriu, todėl chirurgams nereikėtų mokytis naujos operacijos technikos. Atlikome miopinę FRK ir TransFRK, tačiau neabejojame, kad šiuo lazeriu galima atlikti ir hipermetropinę, astigmatinę bei presbiopinę korekcijas, t.y. įmanomos visos korekcijos rūšys, kurios šiuo metu atliekamos nanosekundiniais impulsais, įskaitant reoperacijas. Galimybė greitai perjungti lazerio harmonikas iš UV į IR leidžia panaudoti tą pačią kietojo kūno lazerio sistemą daugybei procedūrų, kurios šiuo metu atliekamos atskirais prietaisais. Tai ne tik visos ragenos refrakcinės procedūros, įskaitant intrastromines, bet ir įvairios keratoplastikos bei kataraktos chirurgija.

Nors eksimerinės technologijos yra tobulinamos jau daugiau kaip 20 metų ir rasti sprendimai esminiams trūkumams pašalinti bei abliacijai optimizuoti, matome galimybių vystytis ir naujai technologijai – femtosekundinei UV ragenos abliacijai.

5.1. Abliacijos femtosekundiniais ultravioletiniais impulsais efektyvumas triušio ragenoje *in vivo*

Mūsų žiniomis, mes pirmą kartą atlikome abliaciją femtosekundiniais UV impulsais *in vivo*, eksperimentams pasirinkę mums prieinamą triušio modelį. Eksperimentai rodo, kad abliacija femtosekundiniais UV impulsais triušių ragenose yra efektyvi ir atkartojama. Abliacija tapo dar efektyvesnė, pakeitus pluoštelio profilį į supergausinį. Atkartojami buvo visi mūsų taikyti femtosekundinės abliacijos variantai, įskaitant transeptelinį. Atkartojamumas yra labai svarbi refrakcinių operacijų sąlyga, nes norint atsisakyti akinių reikia labai tiksliai koreguoti refrakcijos ydas.

Abliuojant skirtingais lazeriais, įvairiuose audiniuose, kaip antai epitelyje ir stromoje, abliacijos našumas gali skirtis priklausomai nuo energijos tankio, dažnio ir skenavimo pavidalo (Stojanovic, Chen et al. 2013). Seileris ir kt. suskaičiavo, kad eksimerinio lazerio abliacijos našumas vienam impulsui epitelyje buvo $0,68 \pm 0,15 \mu\text{m}$, o stromoje $0,55 \pm 0,1 \mu\text{m}$ (Seiler, Kriegerowski et al. 1990), t. y. epitelis abliuojamas šiek tiek greičiau už stromą, nors skirtumas neesminis. Be to, žmogaus paviršinių ir gilesnių stromos sluoksnių abliacijos našumas irgi skiriasi (Huebscher, Genth et al. 1996), o Bowmano zonos abliacijos našumas yra 2,5 karto mažesnis, negu centrinės stromos (Kriegerowski, Bende et al. 1990). Tardami, kad epitelio ir stromos abliacijos našumas panašus, mes apskaičiavome, kad vienu impulsu pašalinto epitelio audinio kiekis (abliacijos našumas) buvo $0,6 \mu\text{m}$. Triušiai neturi Bowmano membranos, todėl abliacijos našumas žmonių ragenose gali skirtis.

Siekiant išvengti pooperacinių komplikacijų, tokių kaip ragenos ektazija ar randėjimas, svarbu pašalinti kuo mažiau sveikų ragenos audinių (Binder 2007). Vertinant regos aštrumą, svarbesnis yra ne pašalintų audinių kiekis, o refrakcijos pokytis. Refrakcijos pokytis teoriškai apskaičiuojamas taikant Munnerlyno (Munnerlyn, Koons et al. 1988) formulę, tačiau medicininių lazerinių sistemų gamintojai sukuria savo algoritmus, atsižvelgdami į vėlyvas refrakcijos baigtis. Refrakcijos baigtys priklauso ne tik nuo pašalinto audinio kiekio, bet ir nuo paviršiaus abliavimo algoritmo bei gijimo eigos. Tikslus abliavimo algoritmas pagal pageidaujamą refrakcijos pokytį femtosekundinei UV abliacijos procedūrai turėtų būti sukurtas atliekant klinikinius tyrimus. Manome, kad mūsų taikytas skenavimo algoritmas neturėtų labai keistis, nes triušių ragenose abliacija buvo ne tik atkartojama ir efektyvi, bet ir greitai. Be to, algoritmas buvo sukurtas atsižvelgiant į ragenos paviršiaus kaitimo mažinimą.

5.2. Miopinės abliacijos femtosekundiniais ultravioletiniais impulsais ir nanosekundiniais ultravioletiniais eksimerinio lazerio impulsais palyginimas

5.2.1. Audinių hidracija ir džiuvimas

Tiriant naujas technologijas, svarbu jas įvertinti visais įmanomais aspektais. Siekdami įvertinti įvairias abliacijos efektyvumą ir galimą veikiančias aplinkybes, tyrėme, kokią įtaką abliacijos našumui turi audinių hidracija. Kaip žinoma, abliacijos eksimeriniu lazeriu tikslumui audinių hidracija labai svarbi (Dougherty, Wellish et al. 1994, Fields, Taylor et al. 1994). Ištyrę ragenos stromos brinkinimo įtaką abliacijos femtosekundiniais UV impulsais našumui, galime teigti, kad abliacijos našumas pabrinkusioje ragenoje yra mažesnis, po brinkinimo stromos paviršius atrodo nelygesnis, o gijimo eiga sunkesnė ir baigtys blogesnės, kai ragena brinkinama abliacijos metu, lyginant su brinkinimu po abliacijos. Mūsų eksperimentai leidžia manyti, kad abliacijos femtosekundiniais UV impulsais, kaip ir eksimeriniu lazeriu, našumas gali priklausyti nuo stromos hidracijos. Iš kitos pusės, sunkesnis šių akių gijimas gali būti susijęs su ilgesne procedūros trukme nei įprastos abliacijos atvejais, taip pat su nelygesniu paviršiumi. Šia kryptimi reikėtų tolimesnių tyrimų, pageidautina, suradus paviršiaus drėgmės kiekybinio matavimo būdą.

Operuojant eksimeriniu lazeriu, laikoma, kad operacinės ir net lauko drėgmė bei temperatūra gali turėti įtakos klinikiniam LASIK rezultatams (de Souza, de Souza et al. 2001, Walter ir Stevenson 2004). Aplinkos santykinė drėgmė gali lemti ragenos dehidraciją (Fisher, Masiello et al. 2003). Dėl šių priežasčių eksimerinio lazerio operacijoje palaikomas specialus mikroklimatas. Kita vertus, Seideris ir kt. (Seider, McLeod et al. 2013), ištyrę refrakcijos rezultatus po mėnesio po LASIK net 202 394 akyse, nenustatė kliniškai reikšmingos sąsajos tarp operacinės drėgmės bei temperatūros ir pooperacinės refrakcijos, tačiau skirtumai buvo statistiškai reikšmingi: $p=0,0094$ temperatūrai ir $p<0,0001$ santykinėi drėgmei. Lugerio ir kt. (Luger, Ewering et al 2014) duomenimis, refrakcijos baigtims turi reikšmės metų laikai. Pavasarį ir vasarą operuotiems trumparegiams pacientams jie nustatė santykinę hipokorekciją (sferinis ekvivalentas $-0,04$ D), o žiemą – nedidelę hiperkorekciją (sferinis ekvivalentas $+0,10$ D). Operuojama buvo Nyderlanduose, kur žiemą santykinė drėgmė mažesnė.

Pastebėjome, kad po abliacijos eksimeriniu lazeriu stromos paviršius stebint mikroskopu atrodė sausesnis nei po TransFRK femtosekundiniais UV impulsais, įskaitant ir gerokai ilgesnę modifikuotą procedūrą. Po abliacijos femtosekundiniais UV

impulsais pachimetriją atlikti buvo paprasta, o po abliacijos nanosekundiniais UV eksimeriniais impulsais dėl sauso paviršiaus RCS pachimetru buvo įmanoma pamatuoti tik sudrėkinus daviklio viršūnę. Kodėl ragenos labiau džiūvo abliuojant eksimeriniu lazeriu? Viena iš priežasčių galėjo būti ta, kad abliacija femtosekundiniais UV impulsais buvo trumpesnė, tačiau pakartojus transepitelinę abliaciją su pertraukomis, imituojančiomis abliacijos eksimeru eigą, paviršius vis tiek atrodė ne toks sausas. Kita priežastis galėjo būti mažesnė santykinė aplinkos drėgmė eksimerinio lazerio operacinėje nei laboratorijoje, kur buvo atliekamos procedūros femtosekundiniu lazeriu. Laboratorijoje santykinė drėgmė nebuvo reguliuojama. Mūsų nuomone, džiūvimo skirtumus labiausiai lemia skirtingi lazerių bangų ilgiai. SBT gerai sugeria eksimerinio lazerio 193 nm bangos ilgio šviesą (Keates, Bloom et al. 1990; Dair, Ashman et al. 2001), ir tai laikoma eksimerinio lazerio trūkumu. Atliekant paviršinę abliaciją eksimeriniu lazeriu po epitelio pašalinimo stengiamasi greitai atlikti abliaciją nedrėkinant ragenos ir tik baigus stromos abliaciją paviršius plaunamas SBT. Nanosekundinių kietojo kūno lazerių 213 nm bangos ilgio spindulius SBT ir fiziologinis tirpalas sugeria mažiau (Dair, Ashman et al. 2001). Atitinkamai, femtosekundinių UV impulsų bangos ilgio (206 nm) spinduliuotę dėl ilgesnio bangos ilgio SBT turėtų sugerti mažiau nei eksimerinio lazerio, todėl aplinkos ir paviršiaus drėgmė turėtų mažiau veikti abliacijos našumą. Mažesnė ragenos dehidracija operacijos metu taip pat būtų pranašumas. Manome, kad abliuojant rageną femtosekundiniais UV impulsais, specialaus mikroklimato operacinėje nereikėtų.

Šiuo metu LASIK operacijai reikalingi du nemaži prietaisai, kurie ne tik užima daug vietos, bet ir veikia aplinką. Farjo ir kt. (Farjo, Sugar et al. 2012) nurodo, kad antrojo aparato, t. y. femtosekundinio lazerio, kaitimas gali daryti įtaką patalpos mikroklimatui. Akivaizdu, kad vienas prietaisas aplinką kaitintų mažiau.

5.2.2. Paviršiaus temperatūros kaitimas

Kai dėmės mažos ir impulsų pasikartojimo dažnis didelis, dėl besikaupiančios energijos gali pakilti ragenos paviršiaus temperatūra. Aukštesnė temperatūra neišvengiamai veikia ragenos gijimą ir skatina randėjimą (Kitazawa, Maekawa et al. 1999), o 40°C laipsnių yra kolageno denatūracijos temperatūra (Bende, Seiler et al. 1988). Siekiant išvengti terminio pažeidimo, svarbu reguliuoti kaitimo procesą. Jei ragenos paviršiaus ir veido temperatūra yra apie 33 °C, tai nepavojingas pakilimas galėtų būti iki 7 °C (Shraiki ir Arba-Mosquera 2011). Kiti autoriai, pavyzdžiui, Bende ir kt (Bende, Seiler et al. 1988) rekomenduoja, kad temperatūra nepakiltų daugiau

nei 11 °C. Shraiki ir Arba-Mosquera nurodo, kad 40°C temperatūroje denatūruojasi ekstrahuotos iš ragenos kolageno molekulės, o skaidulų denatūracija įvyksta apie 65 °C temperatūroje kaitinant kelias minutes. Ląstelės (keratocitai ir endotelio ląstelės) daug jautresnės (Shraiki ir Arba-Mosquera 2011). Nors kai kurie autoriai fotoabliaciją eksimeriniu lazeriu vadina šaltąja abliacija (Iseli, Mrochen et al. 2004), tačiau tyrimai rodo, kad abliacijos metu gretimuose audiniuose temperatūra pakyla apie 8 °C (Bende, Seiler et al. 1988; Maldonado-Codina, Morgan et al. 2001).

Mrochenas ir kt. tyrimuose su eksimerine 1050 Hz pasikartojimo dažnio sistema nustatė, kad kaitimas priklauso nuo dėmių išsidėstymo laike ir erdvėje. Skenuojant ir linijomis, ir cirkuliariai, paviršius smarkiai kaito, kai dėmės susiklodavo, todėl svarbu optimizuoti skenavimo būdus (Mrochen, Schelling et al. 2009). Ragenos kaitimas priklauso nuo korekcijos dydžio, abliacijos profilio, spinduliavimo trukmės, pasikartojimo dažnio, skenavimo būdo, pluoštelio profilio (Mrochen, Schelling et al. 2009; Brunnsmann, Sauer et al. 2010). Yra sukurtas kompiuterinis algoritmas, vadinamas išmaniaja terminio poveikio kontrole (angl. *intelligent thermal effect control*), kuris padeda išvengti dėmių sanklotos nemažinant abliacijos greičio (Brunnsmann, Sauer et al. 2010, de Ortueta, Magnago et al. 2012). Naudojami skeneriai, kurie gali permesti lazerio pluoštelį tarp šūvių į bet kurią vietą. Mūsų lazeriui, kurio pasikartojimo dažnis yra dešimtys kilohercų, lyginant su esamais daugiausia kiloherco pasikartojimo dažnio lazeriais, dabartiniai skeneriai būtų per lėti, todėl galima reguliuoti tik atstumus tarp dėmelių rastro linijose. Shraiki ir Arba-Mosquera (Shraiki and Arba-Mosquera 2011, Arba-Mosquera and M. Shraiki 2010) pasiūlė terminį poveikį vertinti skaičiuojant impulso patekimo į tą pačią vietą dažnį, t. y. lazerio impulsų lokalų dažnį (angl. *local frequency*). Skaičiavimai rodo, kad nepertraukiamos TransFRK femtosekundiniais UV impulsais metu lokalus dažnis abliuojant epitelį buvo 13 Hz, o stromos – 31 Hz. Šie dydžiai mažesni už tipinius eksimerinio lazerio lokalius dažnius (Shraiki and Arba-Mosquera 2011), tačiau dėl mažo femtosekundinių UV impulsų dėmės dydžio terminio poveikio priklausomybė nuo lokalaus dažnio gali skirtis.

Abliacija femtosekundiniais UV impulsais turėtų būti šaltesnė nei nanosekundiniais eksimeriniais UV impulsais. Paviršių apdirbimo pramonėje abliacija femtosekundiniais impulsais laikoma šaltąja abliacija (Steen ir Mazumder 2010). Šiuo atžvilgiu labai trumpi impulsai yra naudingi skaidriose ir atspindinčiose medžiagose, kur pagrindinį vaidmenį atlieka daugiafotonė sugertis. Mūsų tyrimuose stromos kaitimas abliacijos metu taikant femtosekundinius UV ar nanosekundinius eksimerinius

UV impulsus buvo panašus – femtosekundinė UV abliacija nebuvo šaltesnė. Galima manyti, kad esant stipriai absorbcijai ir santykinai žemam energijos tankiui, kaitimas skiriasi tik minimaliai. Reikia pažymėti, kad kiekybiškai palyginti galimi tik pluoštelius, turinčius vienodą erdvinio intensyvumo pasiskirstymą. Kai femtosekundinio lazerio pluoštelis buvo beveik gausinio profilio, didelė impulso energijos dalis kaupėsi pluoštelio kraštuose, ir ši ikislenkstinė energija nebuvo panaudojama abliacijai, o tik kaitino. Pakeitus pluoštelio profilį į supergausinį, daugiau energijos teko abliacijai, ji tapo efektyvesnė, todėl sumažėjo ragenos kaitimas.

Ragenos labiausiai kaito (iki 7 °C) nepertraukiamos TransFRK femtosekundiniais UV impulsais metu. Atlikdami modifikuotą TransFRK femtosekundiniais UV impulsais su pauzėmis nustatėme, kad temperatūra pakilo mažiau (~3 °C), nei abliuojant eksimeriniu lazeriu (~4,5 °C). Akivaizdu, kad temperatūra pakiltų mažiau atliekant ne TransFRK, o to paties gylio standartinę FRK ar LASIK. Be to, temperatūros pakilimas gali būti reikšmingas tik koreguojant didesnes refrakcijos ydas, kai abliacija užtrunka ilgiau.

Matome kelias galimybes susilpninti paviršiaus kaitimą TransFRK metu, kai naudojamas didelio pasikartojimo dažnio lazeris. Paprasčiausia būtų padaryti trumpas pertraukėles lęšio formavimo pabaigoje. Šios pertraukėlės visos procedūros ženkliai nepailgintų. Kita galimybė būtų formuoti lęšį iškart, o ne pašalinus epitelį, t. y. atlikti „apverstą“ TransFRK, dėl ko nereikėtų ilgai skenuoti lazerio spinduliu mažo plotelio. Papildomai kaitimas sumažėtų taikant sudėtingesnius skenavimo algoritmus ir optimizuojant energijos tankį. Optimizavus lazerio ir skenavimo parametrus, paviršiaus temperatūrą dar būtų galima sumažinti šaldant rageną prieš abliaciją atvėsintu SBT (Kitazawa, Maekawa et al. 1999).

5.2.3. Stromos paviršiaus lygumas po abliacijos

Kaip žinoma, nuo paviršiaus lygumo po stromos abliacijos eksimeriniu lazeriu priklauso gijimo baigtys ir subepitelinės miglos laipsnis (Netto, Mohan et al. 2006). Atliekant FRK ir LASIK svarbu, kad abliuotas stromos paviršius būtų kuo lygesnis. Kuo lygesni lopelio stromos paviršiai, tuo mažesnis randėjimas, geresnis pralaidumas šviesai, geresnis kontrastinis matymas, mažesnės optinės aberacijos (Huang ir Arif 2002). Paviršiaus kontūras ir šiurkštumas po abliacijos svarbus ragenos optinei kokybei (Bueeler ir Mrochen 2005). Nededelius nelygumus sulygina regeneruojantis epitelis (Wilson, Mohan et al. 2001). Paviršiaus kontūras priklauso nuo abliacijos

gylio ir nesiskiria, abliuojant skirtingais impulsais, o šiurkštumas po abliacijos labai mažomis dėmėmis mažesnis, todėl didesnė teorinė galimybė, kad po abliacijos femtosekundiniais UV impulsais nelygumus geriau išlygins epitelis.

Stromos lygumą po abliacijos vertinome šviesos mikroskopijos preparatuose. Lyginome preparatus po standartinės abliacijos ir po TransFRK, naudojant femtosekundinius UV impulsus, su preparatais po atitinkamų procedūrų eksimeriniu lazeriu. Mūsų eksperimente iškart po abliacijos paruoštuose histologiniuose preparatuose skirtingais impulsais paveiktų ragenų stromos paviršius atrodo panašaus lygumo. Reikia pripažinti, kad vertinimui trukdė preparatų paruošimo ypatumai, pavyzdžiui, sunku išlaikyti nesusilanksčiusias ragenas prieš audinių dehidraciją ir impregnavimą parafinu. Negalime būti tikri, kad visus pjūvius pavyko padaryti abliacijos ploto centre. Palyginimui, Kimakura ir kt. (Kimakura, Sakai et al. 2013) vertino stromos paviršiaus lygumą po skirtingo gylio pjūvių femtosekundiniu IR lazeriu šviesos mikroskopijos ir skenuojamosios elektroninės mikroskopijos (SEM) preparatuose. Įdomu, kad paviršiaus lygumo vertinimas šiais dviem būdais nesutapo: po 300 μm gylio pjūvio paviršius šviesos mikroskopijos preparatuose buvo lygiausias, o SEM preparatuose nelygiausias. Mes neatlikome SEM, tačiau manome, kad paviršiaus lygumas didesnio padidėjimo vaizde po abliacijos femtosekundiniais UV ir nanosekundiniais UV eksimerinio lazerio impulsais turėtų skirtis femtosekundinės abliacijos naudai, nes femtosekundinių impulsų dėmės dydis buvo apie 15 kartų mažesnis, todėl tikėtina, kad atitinkamai mažesni turėtų būti ir nelygumai.

Atlikome eksperimentą, vienam triušiu dirbtinai suformuodami nelygų stromos paviršių vienoje akyje ir standartinį kitoje. Gijimo baigtys buvo labai panašios. Iš vieno bandymo negalime daryti apibendrinančių išvadų, tačiau šis mūsų eksperimentas gali tapti modeliui tolesniems lygumo įtakos gijimui tyrimams, pritaikius objektyvų lygumo vertinimo metodą. Mažomis femtosekundinių impulsų dėmėmis eksperimentuose galima būtų sumodeliuoti pageidaujamus nelygumus ir įvertinti jų įtaką gijimo eigai ir išėjimams.

Kaip jau minėta, paviršiaus lygumas labai priklauso ir nuo dėmės dydžio. Mūsų taikytas dėmės dydis (130 μm ir 115 μm) yra labai mažas, palyginti su šiuo metu abliacijai naudojamomis dėmėmis (0,2–2 mm), ir tai yra dar vienas abliacijos femtosekundiniais UV impulsais privalumas. Mažiausią dėmės dydį (0,2 mm) nurodo nanosekundinės kietojo kūno sistemos „Lasersoft“ (Katana Technologies, Vokietija) gamintojai (www.katanalaser.com). Kai vienu impulsu pašalinamas labai mažas audinių kiekis, mažesnio dydžio dėmėmis galima suformuoti sudėtingesnius ir tiksles-

nius abliacijos profilius bei koreguoti aukštesnio lygio aberacijas. Sumažėjus dėmei, to paties dydžio plotui nuabliuoti reikia daugiau dėmelių, todėl tam, kad procedūra nebūtų ilga, reikia didesnio impulsų pasikartojimo dažnio. Nuo pasikartojimo dažnio priklauso procedūros trukmė. Mums pavyko sutrumpinti abliacijos trukmę, padidinus pasikartojimo dažnį nuo 20 kHz iki 50 kHz ir kartu vidutinę impulso galią be didesnio poveikio gijimui.

Mrocheno ir kt. (Mrochen, Schelling et al. 2009) nuomone, didesnis dažnis ir mažesnės dėmės teoriškai teikia pranašumą refrakcinėje chirurgijoje. Iš kitos pusės, Huangas ir Arifas (Huang ir Arif 2002) nustatė, kad 1,0 mm ar mažesnės dėmės skenuojančiu lazeriu teoriškai galima pakoreguoti akies optines aberacijas iki ketvirtos eilės, o 0,6 mm dėmė – iki šeštos eilės. Normalioje akyje kliniškai reikšmingos yra aberacijos tik iki ketvirtos eilės. Nedideli nelygumai, likę po paviršinės abliacijos, išsilygina dėl epitelio hiperplazijos ir stromos remodeliavimo (Wilson, Mohan et al. 2001), todėl, šių autorių nuomone, dar mažesnės dėmės aberacijoms koreguoti nereikalingos. Mūsų nuomone, teoriniai apskaičiavimai labai svarbūs, tačiau klinikinėje praktikoje galėtų atsiskleisti tikslesnio profilio pranašumai.

Didesnio dažnio eksimeriniams lazeriams reikia greitesnių akies judesių sekimo sistemų, tikslių skenuojančių veidrodžių ir gero stabilumo (Khoramnia, Salgado et al. 2012). Kai dėmės dydis 250 μm , pakanka sekimo sistemos su 4 milisekundžių (ms) latentškumu (Bueeler ir Mrochen 2005). Šiuolaikinėse eksimerinėse sistemose latentškumas yra 2 ms (Wavelight Ex500 Excimer Laser, Wavelight AG) (www.alconsurgical.com). Akivaizdu, kad apie 100 μm femtosekundinio lazerio dėmei sekimo latentškumas turėtų būti kur kas trumpesnis. Smarkiai pasikeitus ir impulsų pasikartojimo dažniui, lyginant su nanosekundinėmis sistemomis, gali būti sukurtos iš principo naujos skenavimo ir akių judesių kompensavimo sistemos.

5.3. Abliacijos femtosekundiniais ultravioletiniais impulsais greitis. Miopinės transepitelinės fotorefrakcinės keratektomijos ypatumai

Atlikdami standartinę FRK, energijos tankį ir vidutinę UV pluoštelio galią mes parinkome pagal eksimerinio lazerio, kuriuo galėjome naudotis, atitinkamus dydžius. Šiuolaikinių eksimerinių sistemų pasikartojimo dažnis yra kur kas didesnis nei mūsų naudoto eksimerinio lazerio ir siekia apie 1 kHz, be to, šios sistemos naudoja mažesnio skersmens supergausinius pluoštelių, dėl ko padidėja greitis ir tikslumas. Kaip tokių sistemų pavyzdžius galima paminėti „Schwind Amaris 1050RS“ (Schwind eye-

tech-solutions GmbH & Co. KG)(<http://www.eye-tech-solutions.com>), ir „WaveLight EX500“ eksimerinį lazerį, kuris yra refrakcinės sistemos „WaveLight Refractive Suite“ (WaveLight GmbH), į kurią įeina ir atskiras femtosekundinis lazeris, dalis (www.al-consurgical.com). Jų skelbiami abliacijos greičiai yra atitinkamai 1,3 s/D ir 1,4 s/D. Atliekant transepitelinę abliaciją „iRES“ 1 KHz pasikartojimo dažnio lazeriu (iRES, iVIS Technology, Tarantas, Italija), epitelis pašalinamas per 16 s, o 6,0 D miopinė abliacija (optinė zona 6,5 mm, zona su perėjimu 7,5 mm) užtrunka 15 s (Stojanovic, Chen et al. 2013).

Antrosios serijos eksperimentuose atliekant FRK su mechaniniu epitelio pašalinimu, buvo pasiektas 3,7 s/D miopinės abliacijos femtosekundiniais UV impulsais greitis. Nors manėme, kad tai yra pakankamai didelis greitis, tačiau matėme galimybę jį padidinti. Mūsų tyrimų metu keitėsi lazerinės sistemos galimybės, tapo įmanoma naudoti greitesnius skenerius, taikyti didesnės galios impulsus. Be to, pakeitus UV pluoštelio pavidalą iš gausinio į supergausinį, abliacija vyko efektyviau ir miopinės abliacijos laikas sutrumpėjo beveik keturis kartus. Skaiciuojant abliacijos greitį skirtingais būdais, viena miopinė dioptrią 6 mm optinėje zonoje buvo pašalinama per ~1,6 s arba per ~1,45 s, ir tai jau yra pakankamai didelis greitis, lyginant su žmonių ragenų abliacijos greičiu. Svarbu, kad didelis greitis buvo pasiektas, naudojant vien tikslios abliacijos režimą. Šį terminą pasiūlė Arba-Mosquera ir Hollerbachas (Arba-Mosquera ir Hollerbach, 2010). Jie išplėtojo abliacijos dviem energijos tankiais koncepciją, kuria remiantis sukurtas abliacijos būdas naudojamas operuojant „Schwind Amaris“ eksimerinėmis sistemomis. Pirmu etapu abliuojama „grubiau“, t. y. didesnio energijos tankio impulsais, vienu impulsu šalinant didesnę audinių tūrį, todėl padidėja greitis. Antras etapas skirtas išlyginti paviršiui, todėl abliuojama tikslios abliacijos režimu, t. y. mažesnio energijos tankio impulsais, vienu impulsu šalinant mažesnę audinių kiekį ir atitinkamai mažesniu greičiu. Lazeriu „Pharos“ vienu impulsu šalinamas nedidelis audinių kiekis visos abliacijos metu, abliacija vyksta nemažinant greičio, t. y. tikslios abliacijos režimu.

Naudojant „Pharos“ lazerinę sistemą, operacijos trukmė sumažėtų dar ir todėl, kad atliekant LASIK būtų dirbama vienu prietaisu. Nereikėtų nei pacientų kilnoti nuo vieno lazerinio aparato prie kito, nei stumdyti prietaisų. Be to, tos pačios lazerinės sistemos perjungimas iš UV į IR spinduliuotę (harmonikų pakeitimas) ilgai neužtrunka.

Nustatėme, kad didesnis abliacijos greitis pasiektas be didesnio poveikio gijimui. Tirdami vidutinės galios (400 mW) ir didesnio pasikartojimo dažnio (50 kHz) fem-

tosekundinių UV impulsų poveikį, pasirinkome TransFRK procedūrą. TransFRK vyko greitai, buvo atkartojama, mažiau nei abliuojant eksimeriniais impulsais džiūvo ragenos paviršius. Ši procedūra vyksta „be prisilietimo“, yra sterilesnė, leidžia labiau suvienodinti atskirų abliacijos atvejų sąlygas, tačiau dėl aukštesnės temperatūros ir didesnio pašalinto audinių tūrio gali paveikti gijimą. Reikia pažymėti, kad nepertraukiamos TransFRK metu ragenos paviršiaus kaitimas buvo iki 7 °C. Nors jis neviršijo leistino (Shraiki ir Arba-Mosquera 2011), tačiau šiose ragenose subepitelinės drumsitys buvo intensyvesnės nei abliuojant su pertraukomis. Manome, kad temperatūros pakilimą reikėtų ir būtų galima sumažinti (žr 5.2.2).

Mūsų eksperimentuose gijimo procesas ir baigtys po TransFRK nesiskyrė nuo baigčių po FRK operacijos su mechaniniu epitelio pašalinimu. Be to, nustatėme, kad, atliekant vienodo gylio abliaciją tų pačių triušių kontralateralinėse akyse, subepitelinė migla po modifikuotos femtosekundinės UV išsivystė silpnesnė nei po nanosekundinės eksimerinės UV abliacijos. Tiesa, reikia atsižvelgti į tai, kad šioje grupėje buvo tik penki triušiai.

Klinikinėje praktikoje atliekant TransFRK svarbu žinoti epitelio storį. Atskirų individų epitelio storis skiriasi, ir to paties individo epitelio storis yra netolygus (Reinstein, Archer et al 2008), dėl ko nukenčia transepitelinės abliacijos tikslumas. Nors žinoma, kad abliacijos našumas epitelyje ir stromoje, nors nedaug, bet skiriasi, tačiau epitelio storis klinikinėje praktikoje atliekant TransFRK nematuojamas, o nustatomas vidutinis dydis, pavyzdžiui, Stojanovicas ir kt. rekomenduoja nustatyti 65 μm (Stojanovic, Chen et al. 2013). Atliekant „apverstą“ TransFRK „Schwind Amaris“ prietaisais, laikoma, kad 8 mm zonos centre epitelio storis yra 55 μm , o periferijoje 65 μm (Aslanides, Padroni et al. 2012). Stojanovicas ir kt.(Stojanovic, Chen et al. 2013) mano, kad didelės skyros ragenos vaizdavimo technologijos galėtų padėti ateityje prieš operaciją įvertinti ragenos epitelio storį ir tolygumą. Mūsų eksperimentuose filmuojant buvo aiškiai matoma, kaip pasikeičia fluorescencija (dingsta melsva abliuojamo paviršiaus spalva) ir skenuojančio pluoštelio vaizdas, pašalinus epitelį. Fluorescencija matoma ir plika akimi, jei patalpa pakankamai tamsi. Tuftas ir kt. (Tuft, Zabel et al. 1989, Tuft, al-Dhahir et al. 1990) pastebėjo fluorescencijos pasikeitimo momentą ir pasiūlė jį laikyti epitelio pašalinimo pabaiga. Gaminant prietaisą tik ragenos chirurgijai, būtų galima tą momentą fiksuoti vaizdo kameromis ir sukurti programą, kuri atskirai skaičiuotų epitelio ir stromos abliacijos gylį. Tačiau atsižvelgiant į tai, kad yra galimybė tą pačią femtosekundinę lazerinę platformą panaudoti ir

kataraktos chirurgijai, o pastarajai reikia OKT ar kito priekinio segmento vaizdavimo prietaiso, pastarąjį prietaisą būtų galima panaudoti ir epitelio storio matavimui.

Be jokios abejonės, femtosekundiniais UV impulsais būtų galima atlikti ne tik standartinę (epitelio abliacija, paskui lęšio formavimas stromoje), bet ir „apvers-tą“ (lęšio formavimas nuo epitelio, paskui abliacija pagal numatomą epitelio gylį) TransFRK. Maži dėmės dydžiai leidžia suformuoti labai tikslus abliacijos profilius.

Lygindami femtosekundinę ir nanosekundinę TransFRK procedūras, neturėjome galimybės operuoti didelio dažnio (~1000 Hz) eksimeriniu lazeriu, kuriuo kliniki-nėje praktikoje rekomenduojama atlikti transepitelinę abliaciją. Atsiradus galimybei, būtų naudinga palyginti, kuri transepitelinė procedūra (atliekama femtosekundiniais UV impulsais ar didelio dažnio eksimeriniu lazeriu) yra greitesnė, mažiau kaitina rageną, palieka lygesnius paviršius ir lemia mažiau intensyvią subepitelinę miglą.

5.4. Ragenos gijimo procesas ir jo baigtys po abliacijos femtosekundiniais ultravioletiniais impulsais ir nanosekundiniais ultravioletiniais eksimerinio lazerio impulsais

Atlikome skirtingų dėmių dydžių ($280\pm 2\ \mu\text{m}$ ir $130\pm 2\ \mu\text{m}$) FRK, skirtingų gy-lių ($130\ \mu\text{m}$ ir $30\ \mu\text{m}$) FRK, FRK su MMC, dviejų tipų TransFRK (nepertraukiamą $110\ \mu\text{m}$ ir modifikuotą $150\ \mu\text{m}$ su pauzėmis). Palyginimui, eksimeriniu lazeriu atlikome FRK ($30\ \mu\text{m}$) ir TransFRK ($150\ \mu\text{m}$). Daugumos gyvūnų gijimą stebėjome mėnesį, kai kurių gyvūnų – iki šešių mėnesių. Gyvūnų skaičius skirtingų lazerių pa-lyginimo eksperimentuose, remiantis išteklių lygties metodu (Kharan ir Kantharia 2013), buvo pakankamas.

Šiuolaikiniai nanosekundinių lazerių abliacijos algoritmai sukurti tiksliai ap-skaičiuojant refrakcijos pokytį, tačiau FRK ir LASIK baigtis nulemia ragenos žaizdų gijimas, kuris priklauso nuo genetinių veiksnių ir operacijos variacijų. Gijimo pro-cesas mūsų darbe atitiko literatūroje aprašytą triušio modelio gijimo eigą (Gibson, Tuli et al. 2013; Mohan, Hutcheon et al. 2003; Netto, Mohan et al. 2006; Mohan, Stapleton et al. 2008). Ir femtosekundiniais UV, ir nanosekundiniais UV eksimerinio lazerio impulsais abliuotose ragenose intensyviausia subepitelinė migla stebėta po mėnesio, o vėliau ragenos skaidrėjo. McCally ir kt. pastebėjo, kad to paties triušio akys gyja skirtingai, ypač po refrakcinės chirurgijos (McCally, Connolly et al. 2006). Miofibroblastų vystymosi nenuspėjamumas gali būti veiksnys, darantis įtaką skirtin-giems chirurgijos rezultatams (Wilson 2012). Mūsų tyrimuose gerokai didesni gijimo skirtumai taip pat buvo stebėti tarp individualių triušių negu tarp to paties triušio

akių: skirtingai operuotos to paties triušio akys gijo panašiai, o vienodai operuotų skirtingų triušių ragenų gijimas ir subepitelinės miglos laipsnis dažnai skyrėsi.

Atlikę ragenos stromos abliaciją femtosekundiniais UV impulsais ir palyginę su abliacija eksimeriniu lazeriu, mes nustatėme, kad, nepaisant šiems lazeriams būdingų didelių intensyvumo, dėmės skersmens ir impulso trukmės skirtumų, ragenų gijimas vyko panašiai, subepitelinės miglos laipsnis statistiškai nesiskyrė. Statistiškai patikimas skirtumas nustatytas tik lyginant subepitelinę miglą po modifikuotos TransFRK femtosekundiniais UV impulsais (mažesnis miglos laipsnis) su migla tų pačių triušių kontralateralinėse akyse po eksimerinės TransFRK (didesnis miglos laipsnis). Histologiniai preparatai irgi neparodė esminių skirtumų: subepitelinės fibrozės sluoksnis atrodė panašiai, jo storis priklausė nuo subepitelinės miglos laipsnio. Sandersas ir kt. (Sanders, Pujara et al. 2009) rado ląstelinio lygio skirtumų tarp triušių ragenų po abliacijos, atliktos 213 nm ir 193 nm bangos ilgio UV impulsais, nors subepitelinė migla nesiskyrė. Ląsteliniam atsakui ištirti (keratocitų apoptozei, nekrozei, miofibroblastų atsiradimui ir uždegiminių ląstelių infiltracijai) ir mūsų darbe būtų buvę pravartu atlikti imunohistocheminius ir išsamesnius transmisinės elektroninės mikroskopijos tyrimus (Wilson 2002, Netto, Mohan et al. 2005).

Eksperimentuose norėjome įvertinti gijimą įvairiomis aplinkybėmis, atitinkančiomis klinikinę fotoabliacijos pritaikymą, todėl atlikome gilią ir negilią abliacijas, o keliose akyse ir abliaciją su MMC. Kaip tikėtasi, po gilesnių FRK (~130 μm) femtosekundiniais UV impulsais kontralateralinėse tų pačių gyvūnų ragenose subepitelinė migla buvo intensyvesnė nei po seklesnių (~30 μm) (Braunstein, Jain et al. 1996; Moller-Pedersen, Cavanagh et al. 1998). Moller-Pedersenas ir kt. (Moller-Pedersen, Cavanagh et al. 1998) palygino triušių ragenų subepitelinę miglą konfokaliu mikroskopu po mechaninio epitelio pašalinimo ir transepitelinės abliacijos eksimeriniu lazeriu. Jie nustatė, kad subepitelinė migla priklauso nuo abliacijos gylio. Įdomu, kad jų tyrimuose po 3 savaičių 1–2 laipsnio subepitelinė migla buvo matoma net tose akyse, kuriose buvo tik pašalintas epitelis. Subepitelinės miglos intensyvumas ir vystymasis buvo daug ryškesni ragenose po lazerinės abliacijos ir miglos laipsnis priklausė nuo abliacijos gylio (Moller-Pedersen, Cavanagh et al. 1998).

Mūsų eksperimentai rodo, kad abliacijos gylis nebuvo vienintelis subepitelinę miglą nulemiantis veiksnys. Po TransFRK didelio greičio femtosekundiniais UV impulsais, intensyvesnė migla buvo pastebėta po seklesnės abliacijos (110 μm lyginat su 150 μm). Šį skirtumą galėjo lemti triušių gijimo individualūs ypatumai (McCally, Connolly et al. 2006). Šiuo atveju abliacija buvo atlikta skirtingiems triušiams, o ne

kontralateralinėse tų pačių triušių akyse, ir tai galėjo turėti įtakos skirtingai gijimo eigai. Kita priežastimi laikome galimą terminį poveikį stromos paviršiui, nes seklesnė abliacija buvo atliekama be pauzių, dėl ko labiau pakilo paviršiaus temperatūra (iki 7° C). Kadangi toks temperatūros pakilimas laikomas leistinu (Shraiki ir Arba-Mosquera 2011), tvirtai teigti, kad nuo to ragenos drumstėsi labiau, negalime. Būtų įdomu atlikti platesnius tyrimus, tačiau šio darbo tikslas buvo abliacijos skirtingais impulsais palyginimas, o ne terminio poveikio ragenoms tyrimas. Gilesnė transepitelinė abliacija buvo stabdoma, siekiant jos eigą priderinti prie abliacijos mums prienamam eksimeriniu lazeriu, todėl paviršius kaito daug mažiau (iki 3 °C).

Atliekant paviršines abliacijas, subepitelinei miglai išvengti klinikinėje praktikoje taikomas MMC (Carones, Vigo et al. 2002; Santhiago, Netto et al. 2012). Kaip rodo tyrimai, po triušių ragenų abliacijos eksimeriniu lazeriu su MMC (Talamo, Gollamudi et al. 1991; Netto, Mohan et al. 2006) ragenos lieka skaidresnės, nes susidaro plonesnis subepitelinės fibrozės sluoksnis. Mūsų eksperimente, naudojant MMC subepitelinė migla taip pat buvo mažiau intensyvi, skyrėsi jos morfologija. Nors abliacija su MMC atlikta tik trimis triušiams, tačiau manome, kad šį medikamentą būtų galima taikyti gilesnių paviršinių abliacijų metu, kaip yra rekomenduojama operuojant eksimeriniu lazeriu.

Atlikdami eksperimentus mes nepastebėjome, kad femtosekundiniai 206 nm bangos ilgio impulsai veiktų karcinogeniškai. Prieš naudojant femtosekundinius UV impulsus klinikinėje praktikoje, būtina iširti jų mutageninį poveikį. Tyrimai rodo, kad šiuo metu ragenos abliacijai naudojami 193 nm ir 213 nm bangos ilgio impulsai sukelia panašias nedideles DNR pažeidas (Van Saarloos ir Rodger 2007). Mūsų naudotų femtosekundinių UV impulsų bangos ilgis yra trumpesnis (206 nm) nei kietojo kūno nanosekundinio lazerio (213 nm), todėl mutageniškumas turėtų būti panašus arba mažesnis. DNR stipriausiai absorbuoja 240–270 nm bangos ilgio UV spindulius, taigi mūsų naudotas gerokai trumpesnis bangos ilgis šia prasme nepavojingas, tačiau femtosekundinių UV impulsų intensyvumas yra apie 10 000 kartų didesnis už eksimerinio lazerio. Gali būti, kad labai trumpi didelio intensyvumo UV impulsai veikia gyvus audinius kitaip nei eksimerinio ArF lazerio spinduliuotė, todėl privalo būti atliekami genotoksinio ir citotoksinio femtosekundinių UV impulsų poveikio tyrimai. Neplaninės DNR sintezės tyrimas yra būtinas, tačiau tai būtų jau kito darbo tikslas. Manome, kad, atlikus šiuos tyrimus, būtų galima pereiti prie klinikinio abliacijos femtosekundiniais UV impulsais metodo įvertinimo. Šiuo metu tęsiami eksperimentai, lazeriu „Pharos“ formuojant lopelį ir intrastrominius lentikulus.

6. IŠVADOS

1. Triušio ragenų abliacija femtosekundiniais UV impulsais vyko pagal suprogramuotą profilį efektyviai ir tolygiai, gylis buvo atkartojamas, stromos paviršius buvo lygus.
2. Temperatūra net abliacijos didelės galios impulsais metu neviršijo saugaus lygio. Abliuojant femtosekundiniais UV impulsais su pauzėmis, paviršius kaito mažiau, nei abliuojant nanosekundiniais UV eksimerinio lazerio impulsais. Po abliacijos femtosekundiniais UV impulsais stromos paviršius buvo mažiau išdžiūvęs.
3. Atliekant miopinę transepitelinę abliaciją, kai femtosekundinių UV impulsų galia buvo 400 mW ir impulsų pasikartojimo dažnis 50 kHz, abliacijos greitis 6 mm optinėje zonoje pasiekė ~ 1,6 s/D dirbant tik tikslios abliacijos režimu. Šis greitis yra artimas modernių eksimerinių sistemų greičiui.
4. Nepaisant didelių spinduliavimo intensyvumo skirtumų, ragenų gijimas bei subepitelinės miglos vystymasis vyko panašiai kaip po abliacijos eksimeriniu lazeriu. Histologiniuose preparatuose esminių skirtumų nebuvo pastebėta.
5. Mūsų eksperimentai leidžia teigti, kad femtosekundinis kietojo kūno lazeris galėtų pakeisti nanosekundinį dujinį eksimerinį lazerį ragenos lazerinėje refrakcinėje chirurgijoje. Tai būtų ypač naudinga LASIK procedūroje, kur abu operacijos etapus būtų galima atlikti viena lazerine sistema.

7. LITERATŪROS ŠARAŠAS

1. Abbey, A., T. Ide, G. D. Kymionis and S. H. Yoo (2009). Femtosecond laser-assisted astigmatic keratotomy in naturally occurring high astigmatism. *Br J Ophthalmol* 93(12): 1566–1569.
2. Abell, R. G., N. M. Kerr and B. J. Vote (2013). Catalys femtosecond laser-assisted cataract surgery compared to conventional cataract surgery. *Clin Experiment Ophthalmol* 41(5): 455–62.
3. Abell, R. G., N. M. Kerr and B. J. Vote (2013). Toward zero effective phacoemulsification time using femtosecond laser pretreatment. *Ophthalmology* 120(5): 942–948.
4. Abell, R. G. and B. J. Vote (2014). Cost-effectiveness of femtosecond laser-assisted cataract surgery versus phacoemulsification cataract surgery. *Ophthalmology* 121(1): 10–16.
5. Albiets, J. M. and L. M. Lenton (2004). Management of the ocular surface and tear film before, during, and after laser in situ keratomileusis. *J Refract Surg* 20(1): 62–71.
6. Adib-Moghaddam, S., S. Arba-Mosquera, B. Salmanian, A. H. Omidvari and F. Noorizadeh (2014). On-line pachymetry outcome of ablation in aberration free mode TransPRK. *Eur J Ophthalmol* 24(4): 483–489.
7. Alio, J. L., F. Amparo, D. Ortiz and L. Moreno (2009). Corneal multifocality with excimer laser for presbyopia correction. *Curr Opin Ophthalmol* 20(4): 264–271.
8. Alio, J. L., K. Pachkoria, A. E. Aswad and A. B. Plaza-Puche (2013). Laser-Assisted In Situ Keratomileusis in High Mixed Astigmatism With Optimized, Fast-Repetition and Cyclotorsion Control Excimer Laser. *Am J Ophthalmol* 155(5): 829–836.
9. Anderson, I., D. R. Sanders, P. van Saarloos and W. J. t. Ardrey (2004). Treatment of irregular astigmatism with a 213 nm solid-state, diode-pumped neodymium:YAG ablative laser. *J Cataract Refract Surg* 30(10): 2145–2151.
10. Ang, M., S. S. Chaurasia, R. I. Angunawela, R. Poh, A. Riau, D. Tan and J. S. Mehta (2012). Femtosecond lenticule extraction (FLEX): clinical results, interface evaluation, and intraocular pressure variation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53(3): 1414–1421.

11. Ang, M., D. Tan and J. S. Mehta (2012). Small incision lenticule extraction (SMILE) versus laser in-situ keratomileusis (LASIK): study protocol for a randomized, non-inferiority trial. *Trials* 13: 75.
12. Arba-Mosquera, S. and T. Hollerbach (2010). Ablation resolution in laser corneal refractive surgery: the dual fluence concept of the AMARIS platform. *Adv. Opt. Technol.* 2010, 538541.
13. Arba-Mosquera, S. and M. Shraiki (2010). Analysis of the PMMA and cornea temperature rise during excimer laser ablation. *J. Mod. Opt.* 57(5), 400–407.
14. Aslanides, I. M., P. N. Georgoudis, V. D. Selimis and A. N. Mukherjee (2015). Single-step transepithelial ASLA (SCHWIND) with mitomycin-C for the correction of high myopia: long term follow-up. *Clin Ophthalmol* 9: 33–4.
15. Aslanides, I. M., S. Padroni, S. Arba Mosquera, A. Ioannides and A. Mukherjee (2012). Comparison of single-step reverse transepithelial all-surface laser ablation (ASLA) to alcohol-assisted photorefractive keratectomy. *Clin Ophthalmol* 6: 973–980.
16. Azar, D. T., R. T. Ang, J. B. Lee, T. Kato, C. C. Chen, S. Jain, E. Gabison and J. C. Abad (2001). Laser subepithelial keratomileusis: electron microscopy and visual outcomes of flap photorefractive keratectomy. *Curr Opin Ophthalmol* 12(4): 323–328.
17. Bahar, I., I. Kaiserman, P. McAllum and D. Rootman (2008). Femtosecond laser-assisted penetrating keratoplasty: stability evaluation of different wound configurations. *Cornea* 27(2): 209–211.
18. Bamba, S., K. M. Rocha, J. C. Ramos-Esteban and R. R. Krueger (2009). Incidence of rainbow glare after laser in situ keratomileusis flap creation with a 60 kHz femtosecond laser. *J Cataract Refract Surg* 35(6): 1082–1086.
19. Barbosa, F. L., S. S. Chaurasia, A. Cutler, K. Asosingh, H. Kaur, F. W. de Medeiros, V. Agrawal and S. E. Wilson (2010). Corneal myofibroblast generation from bone marrow-derived cells. *Exp Eye Res* 91(1): 92–96.
20. Barraquer, J. (1958). Method for cutting lamellar grafts in frozen corneas. New orientations for refractive surgery. *Arch SocAm Ophthalmol* 1: 237.
21. Bende, T., T. Seiler and J. Wollensak (1988). Side effects in excimer corneal surgery. Corneal thermal gradients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 226(3): 277–280.
22. Binder, P. (2004). Flap dimensions created with the IntraLase FS laser. *J Cataract Refract Surg* 30: 26–32.

23. Binder, P. S. (2007). Analysis of ectasia after laser in situ keratomileusis: risk factors. *J Cataract Refract Surg* 33(9): 1530–1538.
24. Binder, P. S., M. Sarayba, T. Ignacio, T. Juhasz and R. Kurtz (2008). Characterization of submicrojoule femtosecond laser corneal tissue dissection. *J Cataract Refract Surg* 34(1): 146–152.
25. Birnbaum, F., A. Wiggermann, P. C. Maier, D. Bohringer and T. Reinhard (2012). Clinical results of 123 femtosecond laser-assisted penetrating keratoplasties. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 251(1): 95–103.
26. Blum, M., K. Kunert, M. Schroder and W. Sekundo (2010). Femtosecond lenticule extraction for the correction of myopia: preliminary 6-month results. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 248(7): 1019–1027.
27. Blum, M., K. S. Kunert, U. Vossmerbaumer and W. Sekundo (2013). Femtosecond lenticule extraction (ReLEx(R)) for correction of hyperopia – first results. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 251(1): 349–355.
28. Braunstein, R. E., S. Jain, R. L. McCally, W. J. Stark, P. J. Connolly and D. T. Azar (1996). Objective measurement of corneal light scattering after excimer laser keratectomy. *Ophthalmology* 103(3): 439–443.
29. Brunnsmann, U., U. Sauer, K. Dressler, N. Triefenbach and S. Mosquera (2010). Minimisation of the thermal load of the ablation in high-speed laser corneal refractive surgery: the ‘intelligent thermal effect control’ of the AMARIS platform. *Journal of Modern Optics* 57(6): 466–479.
30. Bueeler, M. and M. Mrochen (2005). Simulation of eye–tracker latency, spot size, and ablation pulse depth on the correction of higher order wavefront aberrations with scanning spot laser systems. *J Refract Surg* 21: 28–36.
31. Buratto, L. and M. Ferrari (1992). Excimer laser intrastromal keratomileusis: case reports. *J Cataract Refract Surg* 18(1): 37–41.
32. Buzzonetti, L., G. Petrocelli, A. Laborante, E. Mazzilli, M. Gaspari, P. Valente and E. Francia (2009). A new transepithelial phototherapeutic keratectomy mode using the NIDEK CXIII excimer laser. *J Refract Surg* 25(1 Suppl): S122–124.
33. Calvo, R., J. W. McLaren, D. O. Hodge, W. M. Bourne and S. V. Patel (2010). Corneal aberrations and visual acuity after laser in situ keratomileusis: femtosecond laser versus mechanical microkeratome. *Am J Ophthalmol* 149(5): 785–793.
34. Camellin, M. and D. Wyler (2008). Epi-LASIK versus epi-LASEK. *J Refract Surg* 24(1): S57–63.

35. Carones, F., L. Vigo, E. Scandola and L. Vacchini (2002). Evaluation of the prophylactic use of mitomycin-C to inhibit haze formation after photorefractive keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 28(12): 2088–2095.
36. Casebeer, J., L. Ruiz and S. Slade, Eds. (1996). *Lamellar refractive surgery*, Thorofare, NJ: Slack Inc.
37. Chai, D., G. Chaudhary, E. Mikula, H. Sun, R. Kurtz and T. Juhasz (2010). In vivo femtosecond laser subsurface scleral treatment in rabbit eyes. *Lasers Surg Med* 42(7): 647–651.
38. Chan, A., J. Ou and E. E. Manche (2008). Comparison of the femtosecond laser and mechanical keratome for laser in situ keratomileusis. *Arch Ophthalmol* 126(11): 1484–1490.
39. Chang, J. S. (2008). Complications of sub-Bowman's keratomileusis with a femtosecond laser in 3009 eyes. *J Refract Surg* 24(1): S97–101.
40. Charan, J., N. D. Kantharia (2013). How to calculate sample size in animal studies? *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics* 4(4): 303–306.
41. Chaurasia, S. S., H. Kaur, F. W. de Medeiros, S. D. Smith and S. E. Wilson (2009). Dynamics of the expression of intermediate filaments vimentin and desmin during myofibroblast differentiation after corneal injury. *Exp Eye Res* 89(2): 133–139.
42. Chen, X., A. Stojanovic and T. A. Nitter (2010). Topography-guided transepithelial surface ablation in treatment of recurrent epithelial ingrowths. *J Refract Surg* 26(7): 529–532.
43. Dair, G. T., R. A. Ashman, R. H. Eikelboom, F. Reinholz and P. P. van Saarloos (2001). Absorption of 193- and 213-nm laser wavelengths in sodium chloride solution and balanced salt solution. *Arch Ophthalmol* 119(4): 533–537.
44. Dawson, D. G., H. F. Edelhauser and H. E. Grossniklaus (2005). Long-term histopathologic findings in human corneal wounds after refractive surgical procedures. *Am J Ophthalmol* 139(1): 168–178.
45. de Benito-Llopis, L., M. A. Teus, J. M. Sanchez-Pina and J. L. Hernandez-Verdejo (2007). Comparison between LASEK and LASIK for the correction of low myopia. *J Refract Surg* 23(2): 139–145.
46. de Ortueta, D., T. Magnago, N. Triefenbach, S. Arba Mosquera, U. Sauer and U. Brunsmann (2012). In vivo measurements of thermal load during ablation in high-speed laser corneal refractive surgery. *J Refract Surg* 28(1): 53–58.

47. de Souza, I. R., A. P. de Souza, A. P. de Queiroz, P. Figueiredo, R. S. Jesus and N. Kara-Jose (2001). Influence of temperature and humidity on laser in situ keratomileusis outcomes. *J Refract Surg* 17(2 Suppl): S202–204.
48. Dick, H. B. and T. Schultz (2013). Femtosecond laser-assisted cataract surgery in infants. *J Cataract Refract Surg* 39(5): 665–668.
49. Dougherty, P. J., K. L. Wellish and R. K. Maloney (1994). Excimer laser ablation rate and corneal hydration. *Am J Ophthalmol* 118(2): 169–176.
50. Duffey, R. J. and D. Leaming (2005). US trends in refractive surgery: 2004 ISRS/AAO Survey. *J Refract Surg* 21(6): 742–748.
51. Durrie, D. S. and G. M. Kezirian (2005). 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.
52. Fadlallah, A., D. Fahed, K. Khalil, I. Dunia, J. Menassa, H. El Rami, E. Chlela and S. Fahed (2011). Transepithelial photorefractive keratectomy: clinical results. *J Cataract Refract Surg* 37(10): 1852–1857.
53. Fantes, F. E., K. D. Hanna, G. O. Waring, 3rd, Y. Pouliquen, K. P. Thompson and M. Savoldelli (1990). Wound healing after excimer laser keratomileusis (photorefractive keratectomy) in monkeys. *Arch Ophthalmol* 108(5): 665–675.
54. Farid, M., M. Kim and R. F. Steinert (2007). Results of penetrating keratoplasty performed with a femtosecond laser zigzag incision initial report. *Ophthalmology* 114(12): 2208–2212.
55. Farjo, A. A., A. Sugar, S. C. Schallhorn, P. A. Majmudar, D. J. Tanzer, W. B. Trattler, J. B. Cason, K. E. Donaldson and G. D. Kymionis (2013). Femtosecond lasers for LASIK flap creation: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 120(3): e5–e20.
56. Feizi, S. (2011). Femtosecond laser cataract surgery. *J Ophthalmic Vis Res* 6(2): 151.
57. Feltham, M. H. and F. Stapleton (2002). The effect of water content on the 193 nm excimer laser ablation. *Clin Experiment Ophthalmol* 30(2): 99–103.
58. Fields, C. R., S. M. Taylor and F. M. Barker (1994). Effect of corneal edema upon the smoothness of excimer laser ablation. *Optom Vis Sci* 71(2): 109–114.
59. Fisher, B. T., K. A. Masiello, M. H. Goldstein and D. W. Hahn (2003). Assessment of transient changes in corneal hydration using confocal Raman spectroscopy. *Cornea* 22(4): 363–370.

60. Friedman, N. J., D. V. Palanker, G. Schuele, D. Andersen, G. Marcellino, B. S. Seibel, J. Battle, R. Feliz, J. H. Talamo, M. S. Blumenkranz and W. W. Culbertson (2011). Femtosecond laser capsulotomy. *J Cataract Refract Surg* 37(7): 1189–1198.
61. Fyodorov, S. and V. Durnev (1981). Surgical correction of complicated myopic astigmatism by means of dissection of circular ligament of cornea. *Ann Ophthalmol USSR* 13: 115–118.
62. Gabryte E., Danieliene E., Vaiceliunaite A., Ruksenas O., Vengris M., Danielius R. (2013). All-femtosecond laser-assisted in situ keratomileusis. *Proc. SPIE 8567, Ophthalmic Technologies XXIII*, 85671S-85671D-7.
63. Galgauskas, S., G. Juodkaite and J. Tutkuviene (2014). Age-related changes in central corneal thickness in normal eyes among the adult Lithuanian population. *Clin Interv Aging* 9: 1145–1151.
64. Gaster, R. N., P. S. Binder, K. Coalwell, M. Berns, R. C. McCord and N. L. Burstein (1989). Corneal surface ablation by 193 nm excimer laser and wound healing in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30(1): 90–98.
65. Ghadhfan, F., A. Al-Rajhi and M. D. Wagoner (2007). Laser in situ keratomileusis versus surface ablation: visual outcomes and complications. *J Cataract Refract Surg* 33(12): 2041–2048.
66. Ghanem, R. C. and D. T. Azar (2006). Femtosecond-laser arcuate wedge-shaped resection to correct high residual astigmatism after penetrating keratoplasty. *J Cataract Refract Surg* 32(9): 1415–1419.
67. Ghoreishi, M., A. Naderi Beni and Z. Naderi Beni (2013). Visual outcomes of Femto-LASIK for correction of residual refractive error after corneal graft. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 251(11): 2601–2608.
68. Gibson, D. J., S. S. Tuli and G. S. Schultz (2013). The progression of haze formation in rabbit corneas following phototherapeutic keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54(7): 4776–4781.
69. Haft, P., S. H. Yoo, G. D. Kymionis, T. Ide, T. P. O'Brien and W. W. Culbertson (2009). Complications of LASIK flaps made by the IntraLase 15- and 30-kHz femtosecond lasers. *J Refract Surg* 25(11): 979–984.
70. Hammond, M. D., W. P. Madigan, Jr. and K. S. Bower (2005). Refractive surgery in the United States Army, 2000–2003. *Ophthalmology* 112(2): 184–190.
71. Hanna, K. D., Y. Pouliquen, G. O. Waring, 3rd, M. Savoldelli, J. Cotter, K. Morton and M. Menasche (1989). Corneal stromal wound healing in rabbits after 193-nm excimer laser surface ablation. *Arch Ophthalmol* 107(6): 895–901.

72. Hashemi, H., R. Nazari, J. Amoozadeh, A. H. Beheshtnejad, M. Jabbarvand, M. Mohammadpour and H. Hashemian (2010). Comparison of postoperative higher-order aberrations and contrast sensitivity: tissue-saving versus conventional photorefractive keratectomy for low to moderate myopia. *J Cataract Refract Surg* 36(10): 1732–1740.
73. Hersh, P. S., R. D. Stulting, R. F. Steinert, G. O. Waring, 3rd, K. P. Thompson, M. O'Connell, K. Doney and O. D. Schein (1997). Results of phase III excimer laser photorefractive keratectomy for myopia. The Summit PRK Study Group. *Ophthalmology* 104(10): 1535–1553.
74. Hoffart, L., H. Proust, F. Matonti, C. Baeteman, P. G. De Langlade, J. Conrath and B. Ridings (2009). [Arcuate keratotomy for postkeratoplasty astigmatism by femtosecond laser]. *J Fr Ophtalmol* 32(8): 544–550.
75. <http://www.alconsurgical.com>. Prieiga per internetą, žiūrėta 2014 m. spalio 15 d..
76. <http://www.bausch.com>. Prieiga per internetą, žiūrėta 2014 m. spalio 15 d.
77. <http://www.customvis.com>. Prieiga per internetą, žiūrėta 2014 m. spalio 15 d.
78. <http://www.eye-tech-solutions.com>. Prieiga per internetą, žiūrėta 2014 m. spalio 15 d.
79. <http://www.katanalaser.com>. Prieiga per internetą, žiūrėta 2014 m. spalio 15 d.
80. <http://www.lightcon.com>. Prieiga per internetą, žiūrėta 2014 m. spalio 15 d.
81. Huang, D. and M. Arif (2002). Spot size and quality of scanning laser correction of higher-order wavefront aberrations. *J Cataract Refract Surg* 28(3): 407–416.
82. Huebscher, H. J., U. Genth and T. Seiler (1996). Determination of excimer laser ablation rate of the human cornea using in vivo Scheimpflug videography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(1): 42–46.
83. Iseli, H. P., M. Mrochen, F. Hafezi and T. Sellar (2004). Clinical photoablation with a 500-Hz scanning spot excimer laser. *J Refract Surg* 20(6): 831–834.
84. Ivarsen, A. and J. Hjortdal (2014). Correction of myopic astigmatism with small incision lenticule extraction. *J Refract Surg* 30(4): 240–247.
85. Jester, J. V., P. A. Barry, G. J. Lind, W. M. Petroll, R. Garana and H. D. Cavanagh (1994). Corneal keratocytes: in situ and in vitro organization of cytoskeletal contractile proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35(2): 730–743.
86. Jester, J. V., H. F. Li, W. M. Petroll, R. D. Parker, H. D. Cavanagh, G. J. Carr, B. Smith and J. K. Maurer (1998). Area and depth of surfactant-induced corneal injury correlates with cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(6): 922–936.

87. Jester, J. V., T. Moller-Pedersen, J. Huang, C. M. Sax, W. T. Kays, H. D. Cavanagh, W. M. Petroll and J. Piatigorsky (1999). The cellular basis of corneal transparency: evidence for «corneal crystallins». *J Cell Sci* 112 (Pt 5): 613–622.
88. Jester, J. V., W. M. Petroll and H. D. Cavanagh (1999). Corneal stromal wound healing in refractive surgery: the role of myofibroblasts. *Prog Retin Eye Res* 18(3): 311–356.
89. Juhasz, T., G. A. Kastis, C. Suarez, Z. Bor and W. E. Bron (1996). 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.
90. Juhasz, T., F. Loesel, K. RM, C. Horvath, J. Bille and G. Mourou (1999). Corneal refractive surgery with femtosecond lasers. *IEEE J Sel Top Quantum Electron* 5(4): 902–910.
91. Kanellopoulos, A. J. (2009). Collagen cross-linking in early keratoconus with riboflavin in a femtosecond laser-created pocket: initial clinical results. *J Refract Surg* 25(11): 1034–1037.
92. Keates, R. H., R. T. Bloom, R. T. Schneider, Q. Ren, J. Sohl and J. J. Viscardi (1990). Absorption of 308-nm excimer laser radiation by balanced salt solution, sodium hyaluronate, and human cadaver eyes. *Arch Ophthalmol* 108(11): 1611–1613.
93. Kezirian, G. M. and K. G. Stonecipher (2004). Comparison of the IntraLase femtosecond laser and mechanical keratomes for laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 30(4): 804–811.
94. Khalifa, M., M. El-Kateb and M. S. Shaheen (2009). Iris registration in wave-front-guided LASIK to correct mixed astigmatism. *J Cataract Refract Surg* 35(3): 433–437.
95. Khoramnia, R., M. P. Holzer, A. Fitting, G. U. Auffarth and T. M. Rabsilber (2013). [Functional results after bilateral intrastromal femtosecond laser correction of presbyopia]. *Ophthalmologie* 110(12): 1163–1170.
96. Khoramnia, R., J. P. Salgado, C. P. Lohmann, K. A. Kobuch and C. W. von Mohrenfels (2012). Precision, morphology, and histology of corneal flap cuts using a 200-kHz femtosecond laser. *Eur J Ophthalmol* 22(2): 161–167.
97. Khoramnia, R., J. P. Salgado, C. Wuellner, C. Donitzky, C. P. Lohmann and C. Winkler von Mohrenfels (2012). 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.

98. Kim, J. Y., M. J. Kim, T. I. Kim, H. J. Choi, J. H. Pak and H. Tchah (2006). A femtosecond laser creates a stronger flap than a mechanical microkeratome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(2): 599–604.
99. Kim, P., G. L. Sutton and D. S. Rootman (2011). Applications of the femtosecond laser in corneal refractive surgery. *Curr Opin Ophthalmol* 22(4): 238–244.
100. Kim, W. J., S. Shah and S. E. Wilson (1998). Differences in keratocyte apoptosis following transepithelial and laser-scrape photorefractive keratectomy in rabbits. *J Refract Surg* 14(5): 526–533.
101. Kim, W. S. and J. M. Jo (2001). Corneal hydration affects ablation during laser in situ keratomileusis surgery. *Cornea* 20(4): 394–397.
102. Kimakura, M., O. Sakai, S. Nakagawa, J. Yoshida, R. Shirakawa, T. Toyono, S. Yokoo and S. Amano (2013). Stromal bed quality and endothelial damage after femtosecond laser cuts into the deep corneal stroma. *Br J Ophthalmol* 97(11): 1404–1409.
103. Kitazawa, Y., E. Maekawa, S. Sasaki, T. Tokoro, M. Mochizuki and S. Ito (1999). Cooling effect on excimer laser photorefractive keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 25(10): 1349–1355.
104. Kittelmann, O., G. Korn, and M. Lenzner, Device and procedure for refractive laser surgery, U.S. Patent No. 7,721,743 (25 May 2010).
105. Kittelmann, O., G. Korn, and M. Lenzner, Device and procedure for refractive laser surgery, U.S. Patent No. 8,313,479 (20 November 2012).
106. Korkmaz, S., K. Bilgihan, S. Sul and A. Hondur (2014). A Clinical and Confocal Microscopic Comparison of Transepithelial PRK and LASEK for Myopia. *J Ophthalmol* 2014: 784185.
107. Krauss, J. M., C. A. Puliafito and R. F. Steinert (1986). Laser interactions with the cornea. *Surv Ophthalmol* 31(1): 37–53.
108. Kriegerowski, M., T. Bende, T. Seiler and J. Wollensak (1990). [The ablation behavior of various corneal layers]. *Fortschr Ophthalmol* 87(1): 11–13.
109. Krueger, R. R., T. Juhasz, A. Gualano and V. Marchi (1998). The picosecond laser for nonmechanical laser in situ keratomileusis. *J Refract Surg* 14(4): 467–469.
110. Krueger, R. R., Y. S. Rabinowitz and P. S. Binder (2010). The 25th anniversary of excimer lasers in refractive surgery: historical review. *J Refract Surg* 26(10): 749–760.

111. Krueger, R. R., T. Seiler, T. Gruchman, M. Mrochen and M. S. Berlin (2001). Stress wave amplitudes during laser surgery of the cornea. *Ophthalmology* 108(6): 1070–1074.
112. Krueger, R. R., I. L. Thornton, M. Xu, Z. Bor and T. J. van den Berg (2008). Rainbow glare as an optical side effect of IntraLASIK. *Ophthalmology* 115(7): 1187–1195 e1181.
113. Krueger, R. R. and S. L. Trokel (1985). Quantitation of corneal ablation by ultra-violet laser light. *Arch Ophthalmol* 103(11): 1741–1742.
114. Kubaloglu, A., Y. Cinar, E. S. Sari, A. Koytak, B. Ozdemir and Y. Ozerturk (2010). Comparison of 2 intrastromal corneal ring segment models in the management of keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 36(6): 978–985.
115. Kuo, I. C., S. M. Lee and D. G. Hwang (2004). Late-onset corneal haze and myopic regression after photorefractive keratectomy (PRK). *Cornea* 23(4): 350–355.
116. Kurtz, R. M., C. Horvath, H. H. Liu, R. R. Krueger and T. Juhasz (1998). Lamellar refractive surgery with scanned intrastromal picosecond and femtosecond laser pulses in animal eyes. *J Refract Surg* 14(5): 541–548.
117. Kwitko, M. L., S. Jovkar, H. Yan and S. Rymer (1996). Arcuate keratotomy to correct naturally occurring astigmatism. *J Cataract Refract Surg* 22(10): 1439–1442.
118. Kymionis, G. D., V. F. Diakonis, V. P. Kankariya, A. D. Plaka, S. I. Panagopoulou, G. A. Kontadakis, M. A. Grentzelos, M. K. Tsilimbaris and I. G. Pallikaris (2014). Femtosecond laser-assisted intracorneal biopolymer insertion for the symptomatic treatment of bullous keratopathy. *Cornea* 33(5): 540–543.
119. Lacayo, G. O., 3rd and P. A. Majmudar (2005). How and when to use mitomycin-C in refractive surgery. *Curr Opin Ophthalmol* 16(4): 256–259.
120. Lai, Y. H., H. Z. Wang, C. P. Lin and S. J. Chang (2004). Mitomycin C alters corneal stromal wound healing and corneal haze in rabbits after argon–fluoride excimer laser photorefractive keratectomy. *J Ocul Pharmacol Ther* 20(2): 129–138.
121. Lans, L. (1898). Experimental Investigation of reduction of astigmatism by non-perforating corneal incisions. *Graefes Arch Ophthalmol* 45: 117–152.
122. Lee, B. S., R. L. Lindstrom, S. W. Reeves and D. R. Hardten (2013). Modern management of astigmatism. *Int Ophthalmol Clin* 53(1): 65–78.
123. Lembares, A., X. H. Hu and G. W. Kalmus (1997). Absorption spectra of corneas in the far ultraviolet region. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38(6): 1283–1287.

124. Li, H. F., W. M. Petroll, T. Moller-Pedersen, J. K. Maurer, H. D. Cavanagh and J. V. Jester (1997). Epithelial and corneal thickness measurements by in vivo confocal microscopy through focusing (CMTF). *Curr Eye Res* 16(3): 214–221.
125. Li, Y., O. Tan, R. Brass, J. L. Weiss and D. Huang (2012). Corneal epithelial thickness mapping by Fourier-domain optical coherence tomography in normal and keratoconic eyes. *Ophthalmology* 119(12): 2425–2433.
126. Li, M., Z. Zhou, Y. Shen, M. Knorz, L. Gong and X. Zhou (2014). Comparison of corneal sensation between small incision lenticule extraction (SMILE) and femtosecond laser-assisted LASIK for myopia. *Journal of Refractive Surgery* 30(2): 94–100.
127. Lifshitz, T., J. Levy, I. Klemperer and S. Levinger (2005). Anterior chamber gas bubbles after corneal flap creation with a femtosecond laser. *J Cataract Refract Surg* 31(11): 2227–2229.
128. Lin, D. T., S. R. Holland, K. M. Rocha and R. R. Krueger (2008). Method for optimizing topography-guided ablation of highly aberrated eyes with the ALLEGRETTO WAVE excimer laser. *J Refract Surg* 24(4): S439–445.
129. Lin, F., Y. Xu and Y. Yang (2014). Comparison of the visual results after SMILE and femtosecond laser-assisted LASIK for myopia. *J Refract Surg* 30(4): 248–254.
130. Lindstrom, R. L., S. M. Macrae, J. S. Pepose and P. C. Hoopes, Sr. (2013). Corneal inlays for presbyopia correction. *Curr Opin Ophthalmol* 24(4): 281–287.
131. Lipshitz, I., A. Loewenstein, D. Varssano and M. Lazar (1997). Late onset corneal haze after photorefractive keratectomy for moderate and high myopia. *Ophthalmology* 104(3): 369–373; discussion 373–364.
132. Liu, H., W. Zhu, A. C. Jiang, A. J. Sprecher and X. Zhou (2012). Femtosecond laser lenticule transplantation in rabbit cornea: experimental study. *J Refract Surg* 28(12): 907–911.
133. Lucciola, J. (1896). The surgical treatment of astigmatism. *Arch Ophthalmol*: 16:630–638.
134. Luger, M. H., T. Ewering and S. Arba-Mosquera (2014). Analysis of seasonal changes in residual refraction 1-year after corneal laser refractive surgery: a retrospective study. *J Optom* 7(3): 138–146.
135. Maldonado-Codina, C., P. B. Morgan and N. Efron (2001). Thermal consequences of photorefractive keratectomy. *Cornea* 20(5): 509–515.

136. Marshall, J., S. L. Trokel, S. Rothery and R. R. Krueger (1988). Long-term healing of the central cornea after photorefractive keratectomy using an excimer laser. *Ophthalmology* 95(10): 1411–1421.
137. Masters, B. (1998). Three-dimensional confocal microscopy of the living in situ rabbit cornea. *Opt Express* 3(9): 351–355.
138. McCally, R. L., P. J. Connolly, W. J. Stark, S. Jain and D. T. Azar (2006). Identical excimer laser PTK treatments in rabbits result in two distinct haze responses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(10): 4288–4294.
139. McDonnell, P., A. Nizam, M. Lynn and e. al. (1996). Morning-to-Evening Change in Refraction, Corneal Curvature, and Visual Acuity 11 years after Radial Keratotomy in the Prospective Evaluation of Radial Keratotomy Study. *Ophthalmology* 103: 233–239.
140. Medeiros, F. W., W. M. Stapleton, J. Hammel, R. R. Krueger, M. V. Netto and S. E. Wilson (2007). Wavefront analysis comparison of LASIK outcomes with the femtosecond laser and mechanical microkeratomes. *J Refract Surg* 23(9): 880–887.
141. Meltendorf, C., G. J. Burbach, J. Buhren, R. Bug, C. Ohrloff and T. Deller (2007). Corneal femtosecond laser keratotomy results in isolated stromal injury and favorable wound–healing response. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(5): 2068–2075.
142. Miclea, M., U. Skrzypczak, F. Fankhauser, S. Faust, H. Graener and G. Seifert (2011). Applanation-free femtosecond laser processing of the cornea. *Biomed Opt Express* 2(3): 534–542.
143. Mohan, R. R., A. E. Hutcheon, R. Choi, J. Hong, J. Lee, R. Ambrosio, Jr., J. D. Zieske and S. E. Wilson (2003). Apoptosis, necrosis, proliferation, and myofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK. *Exp Eye Res* 76(1): 71–87.
144. Mohan, R. R., W. M. Stapleton, S. Sinha, M. V. Netto and S. E. Wilson (2008). A novel method for generating corneal haze in anterior stroma of the mouse eye with the excimer laser. *Exp Eye Res* 86(2): 235–240.
145. Moller-Pedersen, T., H. D. Cavanagh, W. M. Petroll and J. V. Jester (1998). Corneal haze development after PRK is regulated by volume of stromal tissue removal. *Cornea* 17(6): 627–639.
146. Montes-Mico, R., A. Rodriguez-Galietero and J. L. Alio (2007). Femtosecond laser versus mechanical keratome LASIK for myopia. *Ophthalmology* 114(1): 62–68.

147. Morishige, N., A. Kesler-Diaz, A. J. Wahlert, R. M. Kurtz, T. Juhasz, M. Sarayba and J. V. Jester (2008). Corneal response to femtosecond laser photodisruption in the rabbit. *Exp Eye Res* 86(5): 835–843.
148. Mrochen, M., U. Schelling, C. Wuellner and C. Donitzky (2009). 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.
149. Mrochen, M., U. Schelling, C. Wuellner and C. Donitzky (2009). Influence of spatial and temporal spot distribution on the ocular surface quality and maximum ablation depth after photoablation with a 1050 Hz excimer laser system. *J Cataract Refract Surg* 35(2): 363–373.
150. Munnerlyn, C. R., S. J. Koons and J. Marshall (1988). Photorefractive keratectomy: a technique for laser refractive surgery. *J Cataract Refract Surg* 14(1): 46–52.
151. Murakami, Y. and E. E. Manche (2011). Comparison of intraoperative subtraction pachymetry and postoperative anterior segment optical coherence tomography of laser in situ keratomileusis flaps. *J Cataract Refract Surg* 37(10): 1879–1883.
152. Myrowitz, E. H. and R. S. Chuck (2009). A comparison of wavefront-optimized and wavefront-guided ablations. *Curr Opin Ophthalmol* 20(4): 247–250.
153. Nagy, Z., R. Cionni, S. S et al. (2011). A new era in cataract surgery: laser refractive cataract surgery. American Academy of Ophthalmology Subspecialty Day: Refractive Surgery. Orlando, FL.
154. Nagy, Z., A. Takacs, T. Filkorn and M. Sarayba (2009). Initial clinical evaluation of an intraocular femtosecond laser in cataract surgery. *J Refract Surg* 25(12): 1053–1060.
155. Nakamura, K., D. Kurosaka, H. Bissen-Miyajima and K. Tsubota (2001). Intact corneal epithelium is essential for the prevention of stromal haze after laser assisted in situ keratomileusis. *Br J Ophthalmol* 85(2): 209–213.
156. Netto, M. V., R. R. Mohan, R. Ambrosio, Jr., A. E. Hutcheon, J. D. Zieske and S. E. Wilson (2005). Wound healing in the cornea: a review of refractive surgery complications and new prospects for therapy. *Cornea* 24(5): 509–522.
157. Netto, M. V., R. R. Mohan, S. Sinha, A. Sharma, W. Dupps and S. E. Wilson (2006). Stromal haze, myofibroblasts, and surface irregularity after PRK. *Exp Eye Res* 82(5): 788–797.

158. Netto, M. V., R. R. Mohan, S. Sinha, A. Sharma, P. C. Gupta and S. E. Wilson (2006). Effect of prophylactic and therapeutic mitomycin C on corneal apoptosis, cellular proliferation, haze, and long-term keratocyte density in rabbits. *J Refract Surg* 22(6): 562–574.
159. Niemz, M. H. (2007). Lasers in ophthalmology. In: Niemz, M. H., author. *Laser-tissue interactions: fundamentals and applications*. Springer, Berlin Heidelberg New York, p. 170–172.
160. Nubile, M., P. Carpineto, M. Lanzini, R. Calienno, L. Agnifili, M. Ciancaglini and L. Mastropasqua (2009). Femtosecond laser arcuate keratotomy for the correction of high astigmatism after keratoplasty. *Ophthalmology* 116(6): 1083–1092.
161. O'Brien, T. P., Q. Li, M. F. Ashraf, D. M. Matteson, W. J. Stark and C. C. Chan (1998). Inflammatory response in the early stages of wound healing after excimer laser keratectomy. *Arch Ophthalmol* 116(11): 1470–1474.
162. Oshika, T., S. D. Klyce, M. K. Smolek and M. B. McDonald (1998). Corneal hydration and central islands after excimer laser photorefractive keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 24(12): 1575–1580.
163. Pallikaris, I. G., V. J. Katsanevaki, M. I. Kalyvianaki and Naoumidi, II (2003). Advances in subepithelial excimer refractive surgery techniques: Epi-LASIK. *Curr Opin Ophthalmol* 14(4): 207–212.
164. Pallikaris, I. G., G. D. Kymionis and N. I. Astyrakakis (2001). Corneal ectasia induced by laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 27(11): 1796–1802.
165. Pallikaris, I. G., M. E. Papatzanaki, E. Z. Stathi, O. Frenschock and A. Georgiadis (1990). Laser in situ keratomileusis. *Lasers Surg Med* 10(5): 463–468.
166. Patel, S. V., L. J. Maguire, J. W. McLaren, D. O. Hodge and W. M. Bourne (2007). Femtosecond laser versus mechanical microkeratome for LASIK: a randomized controlled study. *Ophthalmology* 114(8): 1482–1490.
167. Pedrotti, E., A. Sbabo and G. Marchini (2006). Customized transepithelial photorefractive keratectomy for iatrogenic ametropia after penetrating or deep lamellar keratoplasty. *J Cataract Refract Surg* 32(8): 1288–1291.
168. Perry, M. D. and G. Mourou (1994). Terawatt to petawatt subpicosecond lasers. *Science* 264(5161): 917–924.
169. Pesudovs, K., E. Garamendi and D. B. Elliott (2006). A quality of life comparison of people wearing spectacles or contact lenses or having undergone refractive surgery. *J Refract Surg* 22(1): 19–27.

170. Petroll, W. M., M. Weaver, S. Vaidya, J. P. McCulley and H. D. Cavanagh (2013). Quantitative 3-dimensional corneal imaging in vivo using a modified HRT-RCM confocal microscope. *Cornea* 32(4): e36–43.
171. Pinero, D. P., J. L. Alio, B. El Kady, E. Coskunseven, H. Morbelli, A. Uceda-Montanes, M. J. Maldonado, D. Cuevas and I. Pascual (2009). Refractive and aberrometric outcomes of intracorneal ring segments for keratoconus: mechanical versus femtosecond-assisted procedures. *Ophthalmology* 116(9): 1675–1687.
172. Por, Y. M., J. Y. Cheng, A. Parthasarathy, J. S. Mehta and D. T. Tan (2008). Outcomes of femtosecond laser-assisted penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 145(5): 772–774.
173. Raciukaitis, G., M. Grishin, R. Danielius, J. Pocius and L. Giniunas (2006). High Repetition Rate ps- and fs-DPSS Lasers for Micromachining. International Congress on Applications of Lasers & Electro-Optics, ICALEO 2006, Scottsdale, Arizona, USA, Proceedings on CDROM (Laser Institute of America, 2006).
174. Rad, A. S., M. Jabbarvand and N. Saifi (2004). Progressive keratectasia after laser in situ keratomileusis. *J Refract Surg* 20(5 Suppl): S718–722.
175. Rajan, M. S., D. O’Brart, P. Jaycock and J. Marshall (2006). Effects of ablation diameter on long-term refractive stability and corneal transparency after photorefractive keratectomy. *Ophthalmology* 113(10): 1798–1806.
176. Rapuano, C. J. The Science of Refractive Surgery. In: Rapuano, C. J., author. *Refractive Surgery, Basic and Clinical Science Course*. San Francisco: American Academy of Ophthalmology; 2009. p. 5.
177. Ratkay-Traub, I., I. E. Ferincz, T. Juhasz, R. M. Kurtz and R. R. Krueger (2003). First clinical results with the femtosecond neodymium-glass laser in refractive surgery. *J Refract Surg* 19(2): 94–103.
178. Ratkay-Traub, I., T. Juhasz, C. Horvath, C. Suarez, K. Kiss, I. Ferincz and R. Kurtz (2001). Ultra-short pulse (femtosecond) laser surgery: initial use in LASIK flap creation. *Ophthalmol Clin North Am* 14(2): 347–355, viii–ix.
179. Ready, J. (1971). *Effects of High-power Laser Radiation*. New York: Academic Press.
180. Reinstein, D. Z., T. J. Archer and M. Gobbe (2012). The history of LASIK. *J Refract Surg* 28(4): 291–298.
181. Reinstein, D. Z., T. J. Archer, M. Gobbe, R. H. Silverman and D. J. Coleman (2008). Epithelial thickness in the normal cornea: three-dimensional display with Artemis very high-frequency digital ultrasound. *J Refract Surg* 24(6): 571–581.

182. Reinstein, D. Z., H. Vogelsang, E. Schroeder, M. Bergt, S. Kaiser, Z. Nagy, N. D.R., J. Copland and D. Topa. Customized Corneal Ablation using the Carl Zeiss Meditec Platform: CRS-Master, WASCA, TOSCA, MEL70 and MEL80 Excimer lasers. In: Krueger RR, Applegate RA, MacRae SM, editors. Wavefront customized visual correction: the quest for super-vision II. Thorofare (NJ): Slack; 2004.
183. Reiser, B. J., T. S. Ignacio, Y. Wang, M. Taban, J. M. Graff, P. Sweet, Z. Chen and R. S. Chuck (2005). In vitro measurement of rabbit corneal epithelial thickness using ultrahigh resolution optical coherence tomography. *Vet Ophthalmol* 8(2): 85–88.
184. Ren, Q., R. Gailitis, K. P. Thompson and J. Lin (1990). Ablation of the Cornea and Synthetic–Polymers Using a UV (213 Nm) Solid-State Laser. *Ieee Journal of Quantum Electronics* 26: 2284–2288.
185. Riau, A. K., R. I. Angunawela, S. S. Chaurasia, W. S. Lee, D. T. Tan and J. S. Mehta (2013). Reversible femtosecond laser-assisted myopia correction: a non-human primate study of lenticule re-implantation after refractive lenticule extraction. *PLoS One* 8(6): e67058.
186. Riau, A. K., N. Y. Tan, R. I. Angunawela, H. M. Htoon, S. S. Chaurasia and J. S. Mehta (2012). Reproducibility and age-related changes of ocular parametric measurements in rabbits. *BMC Vet Res* 8: 138.
187. Rocha, K. M., L. Vabre, N. Chateau and R. R. Krueger (2009). Expanding depth of focus by modifying higher-order aberrations induced by an adaptive optics visual simulator. *J Cataract Refract Surg* 35(11): 1885–1892.
188. Roszkowska, A. M., L. De Grazia, P. Ferreri and G. Ferreri (2006). One-year clinical results of photorefractive keratectomy with a solid-state laser for refractive surgery. *J Refract Surg* 22(6): 611–613.
189. Roszkowska, A. M., G. Korn, M. Lenzner, M. Kirsch, O. Kittelmann, R. Zatonski, P. Ferreri and G. Ferreri (2004). 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.
190. Ruckl, T., A. K. Dexl, A. Bachernegg, V. Reischl, W. Riha, J. Ruckhofer, P. S. Binder and G. Grabner (2013). Femtosecond laser-assisted intrastromal arcuate keratotomy to reduce corneal astigmatism. *J Cataract Refract Surg* 39(4): 528–538.
191. Ruiz, L. A., L. M. Cepeda and V. C. Fuentes (2009). Intrastromal correction of presbyopia using a femtosecond laser system. *J Refract Surg* 25(10): 847–854.

192. Sacks, Z. S., R. M. Kurtz, T. Juhasz, G. Spooner and G. A. Mouroua (2003). Sub-surface photodisruption in human sclera: wavelength dependence. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 34(2): 104–113.
193. Salomao, M. Q., R. Ambrosio, Jr. and S. E. Wilson (2009). Dry eye associated with laser in situ keratomileusis: Mechanical microkeratome versus femtosecond laser. *J Cataract Refract Surg* 35(10): 1756–1760.
194. Salomao, M. Q. and S. E. Wilson (2009). Corneal molecular and cellular biology update for the refractive surgeon. *J Refract Surg* 25(5): 459–466.
195. Sanders, T., T. Pujara, S. Camelo, C. T. Lai, P. Van Saarloos, L. Beazley and J. Rodger (2009). A comparison of corneal cellular responses after 213-nm compared with 193-nm laser photorefractive keratectomy in rabbits. *Cornea* 28(4): 434–440.
196. Santhiago, M. R., M. V. Netto and S. E. Wilson (2012). Mitomycin C: biological effects and use in refractive surgery. *Cornea* 31(3): 311–321.
197. Santhiago, M. R., V. Singh, F. L. Barbosa, V. Agrawal and S. E. Wilson (2011). Monocyte development inhibitor PRM-151 decreases corneal myofibroblast generation in rabbits. *Exp Eye Res* 93(5): 786–789.
198. Sarayba, M. A., R. M. Kurtz, T. T. Nguyen, T. Ignacio, M. Mansoori, P. M. Sweet and R. S. Chuck (2005). Femtosecond laser-assisted intracorneal keratoprosthesis implantation: a laboratory model. *Cornea* 24(8): 1010–1014.
199. Sato, T. (1939). Treatment of conical cornea (incision of Descemet's membrane). *Acta Soc Ophthalmol Jpn* 43: 544–555.
200. Sayegh, F. N. (1996). The correlation of corneal refractive power, axial length, and the refractive power of the emmetropizing intraocular lens in cataractous eyes. *Ger J Ophthalmol* 5(6): 328–331.
201. Schiötz, L. and L. Schiötz (1885). Case of high corneal astigmatism after cataract surgery: improved surgical technique. *Arch Augenheilkd* 15: 178–181.
202. Seider, M. I., S. D. McLeod, T. C. Porco and S. C. Schallhorn (2013). The effect of procedure room temperature and humidity on LASIK outcomes. *Ophthalmology* 120(11): 2204–2208.
203. Seiler, T., G. Kahle and M. Kriegerowski (1990). Excimer laser (193 nm) myopic keratomileusis in sighted and blind human eyes. *Refract Corneal Surg* 6(3): 165–173.

204. Seiler, T., M. Kriegerowski, N. Schnoy and T. Bende (1990). Ablation rate of human corneal epithelium and Bowman's layer with the excimer laser (193 nm). *Refract Corneal Surg* 6(2): 99–102.
205. Sekundo, W., K. Kunert, C. Russmann, A. Gille, W. Bissmann, G. Stobrawa, M. Sticker, M. Bischoff and M. Blum (2008). 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.
206. Sekundo, W., K. S. Kunert and M. Blum (2011). 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.
207. Serrao, S., L. Buratto, G. Lombardo, M. P. De Santo, P. Ducoli and M. Lombardo (2012). Optimal parameters to improve the interface quality of the flap bed in femtosecond laser-assisted laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 38(8): 1453–1459.
208. Serrao, S. and M. Lombardo (2005). Corneal epithelial healing after photorefractive keratectomy: analytical study. *J Cataract Refract Surg* 31(5): 930–937.
209. Seyeddain, O., A. Bachernegg, W. Riha, T. Ruckl, H. Reitsamer, G. Grabner and A. K. Dextl (2013). Femtosecond laser-assisted small-aperture corneal inlay implantation for corneal compensation of presbyopia: Two-year follow-up. *J Cataract Refract Surg* 39(2): 234–241.
210. Shah, R. and S. Shah (2011). Effect of scanning patterns on the results of femtosecond laser lenticule extraction refractive surgery. *J Cataract Refract Surg* 37(9): 1636–1647.
211. Shah, R., S. Shah and S. Sengupta (2011). Results of small incision lenticule extraction: All-in-one femtosecond laser refractive surgery. *J Cataract Refract Surg* 37(1): 127–137.
212. Shah, R. A. and S. E. Wilson (2010). Use of mitomycin-C for phototherapeutic keratectomy and photorefractive keratectomy surgery. *Curr Opin Ophthalmol* 21(4): 269–273.
213. Shah, S. U. and D. C. Gritz (2012). Application of the femtosecond laser LASIK microkeratome in eye banking. *Curr Opin Ophthalmol* 23(4): 257–263.
214. Shousha, M. A. and S. H. Yoo (2010). New therapeutic modalities in femtosecond laser-assisted corneal surgery. *Int Ophthalmol Clin* 50(3): 149–160.

215. Shraiki, M. and S. Arba-Mosquera (2011). Simulation of the impact of refractive surgery ablative laser pulses with a flying-spot laser beam on intrasurgery corneal temperature. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(6): 3713–3722.
216. Sia, R. K., D. S. Ryan, J. D. Edwards, R. D. Stutzman and K. S. Bower (2014). The U.S. Army Surface Ablation Study: comparison of PRK, MMC-PRK, and LASEK in moderate to high myopia. *J Refract Surg* 30(4): 256–264.
217. Sletten, K. R., K. G. Yen, S. Sayegh, F. Loesel, C. Eckhoff, C. Horvath, M. Meunier, T. Juhasz and R. M. Kurtz (1999). An in vivo model of femtosecond laser intrastromal refractive surgery. *Ophthalmic Surg Lasers* 30(9): 742–749.
218. Solomon, K. D., L. E. Fernandez de Castro, H. P. Sandoval, J. M. Biber, B. Groat, K. D. Neff, M. S. Ying, J. W. French, E. D. Donnenfeld, R. L. Lindstrom and L. S. T. F. Joint (2009). LASIK world literature review: quality of life and patient satisfaction. *Ophthalmology* 116(4): 691–701.
219. Soong, H. K. and J. B. Malta (2009). Femtosecond lasers in ophthalmology. *Am J Ophthalmol* 147(2): 189–197 e182.
220. Steen, W. and J. Mazumder (2010). *Laser Material Processing*. London: Springer: 371–386.
221. Stern, D., R. W. Schoenlein, C. A. Puliafito, E. T. Dobi, R. Birngruber and J. G. Fujimoto (1989). Corneal ablation by nanosecond, picosecond, and femtosecond lasers at 532 and 625 nm. *Arch Ophthalmol* 107(4): 587–592.
222. Stojanovic, A., S. Chen, X. Chen, F. Stojanovic, J. Zhang, T. Zhang and T. P. Utheim (2013). One-step transepithelial topography-guided ablation in the treatment of myopic astigmatism. *PLoS One* 8(6): e66618.
223. Stojanovic, A. and T. A. Nitter (2001). Correlation between ultraviolet radiation level and the incidence of late-onset corneal haze after photorefractive keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 27(3): 404–410.
224. Stonecipher, K., T. S. Ignacio and M. Stonecipher (2006). 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.
225. Stonecipher, K. G., J. G. Dishler, T. S. Ignacio and P. S. Binder (2006). Transient light sensitivity after femtosecond laser flap creation: clinical findings and management. *J Cataract Refract Surg* 32(1): 91–94.

226. Stramer, B. M., J. D. Zieske, J. C. Jung, J. S. Austin and M. E. Fini (2003). Molecular mechanisms controlling the fibrotic repair phenotype in cornea: implications for surgical outcomes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(10): 4237–4246.
227. Sugar, A. (2002). Ultrafast (femtosecond) laser refractive surgery. *Curr Opin Ophthalmol* 13(4): 246–249.
228. Sugar, A., C. J. Rapuano, W. W. Culbertson, D. Huang, G. A. Varley, P. J. Agapitos, V. P. de Luise and D. D. Koch (2002). Laser in situ keratomileusis for myopia and astigmatism: safety and efficacy: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 109(1): 175–187.
229. Sutton, G., S. J. Bali and C. Hodge (2013). Femtosecond cataract surgery: transitioning to laser cataract. *Curr Opin Ophthalmol* 24(1): 3–8.
230. Sutton, G. and C. Hodge (2008). Accuracy and precision of LASIK flap thickness using the IntraLase femtosecond laser in 1000 consecutive cases. *J Refract Surg* 24(8): 802–806.
231. Sutton, G. L. and P. Kim (2010). Laser in situ keratomileusis in 2010 – a review. *Clin Experiment Ophthalmol* 38(2): 192–210.
232. Tackman, R. N., J. V. Kuri, L. D. Nichamin and K. Edwards (2011). Anterior capsulotomy with an ultrashort-pulse laser. *J Cataract Refract Surg* 37(5): 819–824.
233. Talamo, J. H., S. Gollamudi, W. R. Green, Z. De La Cruz, V. Filatov and W. J. Stark (1991). Modulation of corneal wound healing after excimer laser keratomileusis using topical mitomycin C and steroids. *Arch Ophthalmol* 109(8): 1141–1146.
234. Taneri, S., J. D. Zieske and D. T. Azar (2004). Evolution, techniques, clinical outcomes, and pathophysiology of LASEK: review of the literature. *Surv Ophthalmol* 49(6): 576–602.
235. Tanna, M., S. C. Schallhorn and K. A. Hettinger (2009). Femtosecond laser versus mechanical microkeratome: a retrospective comparison of visual outcomes at 3 months. *J Refract Surg* 25(7 Suppl): S668–671.
236. Tanzer, D. J., T. Brunstetter, R. Zeber, E. Hofmeister, S. Kaupp, N. Kelly, M. Mirzaoff, W. Sray, M. Brown and S. Schallhorn (2013). Laser in situ keratomileusis in United States Naval aviators. *J Cataract Refract Surg* 39(7): 1047–1058.
237. Teus, M. A., L. de Benito-Llopis and J. L. Alio (2009). Mitomycin C in corneal refractive surgery. *Surv Ophthalmol* 54(4): 487–502.
238. Thornton, I., M. Xu and R. R. Krueger (2008). Comparison of standard (0.02%) and low dose (0.002%) mitomycin C in the prevention of corneal haze following surface ablation for myopia. *J Refract Surg* 24(1): S68–76.

239. Torres, L. F., C. Sancho, B. Tan, K. Padilla, D. J. Schanzlin and A. S. Chayet (2007). Early postoperative pain following Epi-LASIK and photorefractive keratectomy: a prospective, comparative, bilateral study. *J Refract Surg* 23(2): 126–132.
240. Torricelli, A. A., V. Singh, V. Agrawal, M. R. Santhiago and S. E. Wilson (2013). Transmission electron microscopy analysis of epithelial basement membrane repair in rabbit corneas with haze. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54(6): 4026–4033.
241. Trattler, W. B. and S. D. Barnes (2008). Current trends in advanced surface ablation. *Curr Opin Ophthalmol* 19(4): 330–334.
242. Trokel, S. L., R. Srinivasan and B. Braren (1983). Excimer laser surgery of the cornea. *Am J Ophthalmol* 96(6): 710–715.
243. Tsiklis, N. S., G. D. Kymionis, G. A. Kounis, Naoumidi, II and I. G. Pallikaris (2008). 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.
244. Tsiklis, N. S., G. D. Kymionis, G. A. Kounis, A. I. Pallikaris, V. F. Diakonis, S. Charisis, M. M. Markomanolakis and I. G. Pallikaris (2007). 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.
245. Tuft, S., R. al-Dhahir, P. Dyer and Z. H. Zhu (1990). Characterization of the fluorescence spectra produced by excimer laser irradiation of the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31(8): 1512–1518.
246. Tuft, S. J., R. W. Zabel and J. Marshall (1989). Corneal repair following keratectomy. A comparison between conventional surgery and laser photoablation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30(8): 1769–1777.
247. Van Saarloos, P. and J. Rodger (2007). Histological changes and unscheduled DNA synthesis in the rabbit cornea following 213-nm, 193-nm, and 266-nm irradiation. *J Refract Surg* 23: 477–481.
248. Vengris, M., E. Gabryte, A. Aleknavicius, M. Barkauskas, O. Ruksenas, A. Vaiceliunaite and R. Danielius (2010). Corneal shaping and ablation of transparent media by femtosecond pulses in deep ultraviolet range. *J Cataract Refract Surg* 36(9): 1579–1587.
249. von Jagow, B. and T. Kohnen (2009). Corneal architecture of femtosecond laser and microkeratome flaps imaged by anterior segment optical coherence tomography. *J Cataract Refract Surg* 35(1): 35–41.

250. Walter, K. A. and A. W. Stevenson (2004). Effect of environmental factors on myopic LASIK enhancement rates. *J Cataract Refract Surg* 30(4): 798–803.
251. Wang, X. and Q. Wu (2013). Normal corneal thickness measurements in pigmented rabbits using spectral-domain anterior segment optical coherence tomography. *Vet Ophthalmol* 16(2): 130–134.
252. Waring, G., III, M. Lynn, P. McDonnell and a. t. P. s. group. (1994). Results of the Prospective Evaluation of Radial Keratotomy(PERK) Study 10 years after Surgery. *Arch Ophthalmol* 112: 1298–1308.
253. Waring, G., M. Lynn, B. Fielding and e. al. (1990). Results of the Prospective Evaluation of Radial Keratotomy (PERK) Study 4 years after surgery for myopia. *JAMA* 263: 1083–1091.
254. Waring, G. O. t. and D. E. Berry (2013). Advances in the surgical correction of presbyopia. *Int Ophthalmol Clin* 53(1): 129–152.
255. Wilson, S. E. (2002). Analysis of the keratocyte apoptosis, keratocyte proliferation, and myofibroblast transformation responses after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. *Trans Am Ophthalmol Soc* 100: 411–433.
256. Wilson, S. E. (2012). Corneal myofibroblast biology and pathobiology: generation, persistence, and transparency. *Exp Eye Res* 99: 78–88.
257. Wilson, S. E., Y. G. He, J. Weng, Q. Li, A. W. McDowall, M. Vital and E. L. Chwang (1996). Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp Eye Res* 62(4): 325–327.
258. Wilson, S. E., R. R. Mohan, J. W. Hong, J. S. Lee, R. Choi and R. R. Mohan (2001). The wound healing response after laser in situ keratomileusis and photorefractive keratectomy: elusive control of biological variability and effect on custom laser vision correction. *Arch Ophthalmol* 119(6): 889–896.
259. Winkler von Mohrenfels, C., R. Khoramnia, J. Salgado, C. Wullner, C. Donitzky, M. Maier and C. P. Lohmann (2012). First clinical results with a new 200 kHz femtosecond laser system. *Br J Ophthalmol* 96(6): 788–792.
260. Xu, H., S. Liu, X. Xia, P. Huang, P. Wang and X. Wu (2001). Mitomycin C reduces haze formation in rabbits after excimer laser photorefractive keratectomy. *J Refract Surg* 17(3): 342–349.
261. Yenaleyev, F. (1979). Experience of surgical treatment of myopia. *Ann Ophthalmol USSR* 3: 52–55.

262. Yoo, S. H., G. D. Kymionis, A. Koreishi, T. Ide, D. Goldman, C. L. Karp, T. P. O'Brien, W. W. Culbertson and E. C. Alfonso (2008). Femtosecond laser-assisted sutureless anterior lamellar keratoplasty. *Ophthalmology* 115(8): 1303–1307, 1307 e1301.
263. Zhang, J., Y. H. Zhou, L. Tian and C. B. Zhai (2013). Comparison of Ziemer FEMTO LDV Classic and Crystal Line femtosecond laser flap quality by Fourier-domain optical coherence tomography. *Int J Ophthalmol* 6(5): 611–617.
264. Zhou, Y., L. Tian, N. Wang and P. J. Dougherty (2011). Anterior segment optical coherence tomography measurement of LASIK flaps: femtosecond laser vs microkeratome. *J Refract Surg* 27(6): 408–416.
265. Zieske, J. D., S. R. Guimaraes and A. E. Hutcheon (2001). Kinetics of keratocyte proliferation in response to epithelial debridement. *Exp Eye Res* 72(1): 33–39.

8. PUBLIKACIJŲ IR PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS

Disertacijos tema publikuoti darbai

1. Danieliene E., Gabryte E., Danielius R., Vengris M., Vaiceliunaite A., Morkunas V., Ruksenas O. Corneal stromal ablation with femtosecond ultraviolet pulses in rabbits. *J. Cataract Refract. Surg.* 39, 258–267 (2013).
2. Danieliene E., E Gabryte E., Vengris M., Ruksenas O., Gutauskas A., Morkunas V., Danielius R. High-speed photorefractive keratectomy with femtosecond ultraviolet pulses. *J. Biomed. Opt.* 20(5), 051037 (2015). doi:10.1117/1.JBO.20.5.051037
3. Gabrytė E., Danieliene E., Vaiceliunaite A., Ruksenas O., Vengris M., Danielius R. All-femtosecond laser-assisted in situ keratomileusis. *Proc. SPIE 8567, Ophthalmic Technologies XXIII*, 85671S-85671D-7 (2013). doi:10.1117/12.2004688

Disertacijos tema pristatyti pranešimai

1. Danielienė E., Danielius R., Gabrytė E., Rukšėnas O., Vaičeliūnaitė A., Vengris M. Žodinis pranešimas „Corneal stromal ablation by femtosecond UV pulses: in vivo study“. Tarptautinė konferencija „The World Ophthalmology Congress (WOC)“. 2010 m. birželio 5–9 d., Berlynas, Vokietija.
2. Danielienė E., Danielius R., Gabrytė E., Morkūnas V., Rukšėnas O., Vaičeliūnaitė A., Vengris M. Žodinis pranešimas „Ablation of rabbit cornea by femtosecond ultraviolet pulses“. Tarptautinė konferencija „The XIII Forum Ophthalmologicum Balticum“. 2010 m. rugpjūčio 20–22 d., Vilnius.
3. Gabrytė E., Danielienė E., Vaičeliūnaitė A., Rukšėnas O., Vengris M., Danielius R. Žodinis pranešimas „High-speed transepithelial corneal ablation using a solid-state femtosecond laser based system“. Tarptautinė konferencija „Laser Applications in Life Sciences“. 2014 m. birželio 29 d.–liepos 2 d., Ulmas, Vokietija.
4. Gabrytė E., Danielienė E., Vaičeliūnaitė A., Rukšėnas O., Vengris M., Danielius R. Žodinis pranešimas „Universali femtosekundinė lazerinė sistema regos ydų korekcijai“. Ketvirtoji Jaunųjų mokslininkų konferencija „Fizinių ir technologijos mokslų tarpdalykiniai tyrimai“. 2014 m. vasario 11 d., Vilnius.

5. Gabrytė E., Danielienė E., Vaičeliūnaitė A., Rukšėnas O., Vengris M., Danielius R. Stendinis pranešimas „Complete LASIK Procedure Using a Solid-State Femtosecond Laser Based System“. Tarptautinė konferencija „European Conferences on Biomedical Optics“. 2013 m. gegužės 12–16 d., Miunchenas, Vokietija.
6. Gabrytė E., Danielienė E., Vaičeliūnaitė A., Rukšėnas O., Vengris M., Danielius R. Žodinis pranešimas „LASIK lazerinė refrakcinė regos korekcija naudojant femtosekundinę kietojo kūno lazerinę sistemą“. 40-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija. 2013 m. birželio 12 d., Vilnius.
7. Gabrytė E., Danielienė E., Vaičeliūnaitė A., Rukšėnas O., Vengris M., Danielius R. Stendinis pranešimas „All-femtosecond laser-assisted in situ keratomileusis“. Tarptautinė konferencija „Photonics West 2013“. 2013 m. vasario 2–7 d., San Franciskas, JAV.
8. Gabrytė E., Vengris M., Danielius R., Rukšėnas O., Vaičeliūnaitė A., Danielienė E. Stendinis pranešimas „Femtosecond solid-state UV laser system for the refractive eye surgery“. Tarptautinė konferencija „Open readings“, 2011 m. kovo 17–19 d., Vilnius.
9. Rukšėnas O., Danielienė E., Danielius R., Vengris M., Morkūnas V. Stendinis pranešimas „The rabbit eye as a model system for corneal ablation using femtosecond UV pulses“. Tarptautinė konferencija „LASA Winter meeting“. 2009 m. lapkričio 25–27 d., Birmingemas, Jungtinė Karalystė.

Kitos publikacijos

1. Morkunas V., Ruksenas O., Vengris M., Gabryte E., Danieliene E., Danielius R. DNA damage in bone marrow cells induced by ultraviolet femtosecond laser irradiation, *Photomed. Laser Surg.* 29(4), 239-244 (2011).
2. Giniūnaitė A.M., Danielienė E. Žmonių su nenormalia stereopsija gylio suvokimas ir astenopijos simptomai trijų dimensijų kine. *Medicinos teorija ir praktika* 19(2), 119-123 (2013).
3. Jusaitienė G., Kazlauskaitė E. Ragenos distrofijos ir degeneracijos (mokymo priemonė). *Vilniaus universitetas* (1989).
4. Дикчюс Г., Казлаускайте Э., Пискарскас А., Тупчяускас А., Юсайтене Г. Субклеточные повреждения сетчатки глаза лазерным излучением. В кн.: *Исследование структуры, физических свойств и энергетики биологически активных молекул.* Вильнюс: Мокслас, с. 153–157 (1986).

Kiti pranešimai

1. Rukšėnas O., Morkūnas V., Vengris M., Danielius R., Danielienė E. Stendinis pranešimas „Investigation of genotoxicity of ultraviolet laser irradiation“. Tarptautinė konferencija „The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences“. 2009 m. liepos 27–rugpjūčio 1 d., Kiotas, Japonija.
2. Gabrytė E., Vengris M., Danielius R., Danielienė E., Vaičeliūnaitė A. Stendinis pranešimas „Ragenos lopo formavimas femtosekundinio kietakūnio Yb:KGW lazerio impulsais“. 39-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija. 2011 m. spalio 6–8 d., Vilnius.
3. Giniunaitė A. M., Danielienė E. Stendinis pranešimas „Relationship between the results of stereopsis tests, asthenopia and depth perception in three-dimensional movies in subjects without normal stereopsis“. Tarptautinė konferencija „The XIV Forum Ophthalmologicum Balticum“. 2013 m. rugpjūčio 23–24 d., Talinas, Estija.
4. Kazlauskaite E., Dziubak N. Stendinis pranešimas “Atropine cycloplegia in children refraction after two times instillation versus findings after three days of atropinization”. Tarptautinė konferencija „Xth Congress of the European Society of Ophthalmology“. 1995 m. birželio 25–29 d., Milanai, Italija.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju kiekvienam mūsų darbo grupės nariui, visų pirma Eglei Gabrytei už tai, kad ji pasirinko fiziką, ir ypač už neįkainojamą pagalbą rengiant grafinę medžiagą. Ačiū prof. Osvaldai Rukšėnui už mokslininko pavyzdį ir vertingus patarimus, doc. Mikui Vengriui už techninę pagalbą ir konsultacijas rengiant mokslinius straipsnius, dr. Vaidotui Morkūnui už kolegiškumą ir Agnei Vaičeliūnaitei už pagalbą dirbant su gyvūnais, Algirdui Gutauskui už atliktas operacijas eksimeriniu lazeriu, dr. Donatui Petroškai už konsultacijas vertinant histologinius preparatus, prof. dr. Janinai Tutkuvienei už nuolatinį palaikymą, nuoširdų bendravimą, vertingus patarimus ir kritines pastabas rengiant disertaciją.

UAB „Neurovita“ dėkoju, kad leido tyrimams naudoti prietaisą „OPD-Scan II“ (ARK 10000, Nidek).

UAB „Akių gydytojų praktika“ direktorei, kolegei ir draugei Loretai Šveikauskienei esu dėkinga už tai, kad sudarė geriausias sąlygas dirbti mokslinį darbą ir kartu džiaugėsi rezultatais, vivariumo darbuotojoms doc. Virginijai Bukelskienei, Rasai Jarašienei, ponioms Vidai ir Liudai už geranoriškumą ir pagalbą prižiūrint gyvūnus.

Be abejonės, didžiausios padėkos nusipelno mano vyras ir bendraautoris Romualdas Danielius, be kurio nieko nebūtų buvę – nei femtosekundinio lazerio „Pharos“, nei supratimo, kuo skiriasi energijos tankis nuo intensyvumo. Jo dėka įsitikinau, kad niekada ne per vėlu imtis ko nors naujo. Mamai Aldonai Kazlauskienei esu dėkinga už tai, kad nuo vaikystės buvau mokoma, jog žinios yra svarbiausia. Sūnaus Jonui šypsena yra akstinas eiti pirmyn.

Nuoširdžiai dėkoju ir visiems čia nepaminėtiesiems, kurie palaiko ir skatina tęsti darbus.

Šis mokslinis tyrimas iš dalies buvo finansuotas Lietuvos Valstybinio mokslo ir studijų fondo (dotacijos nr. B-07008).